INSTITUTO BOTÂNICO DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

BOLETIM
DA
SOCIEDADE BROTERIANA

(FUNDADO EM 1880 PELO DR. JÚLIO HENRIQUES)

VOL. XX (2.ª SÉRIE)

REDACTOR
DR. A. FERNANDES
Director do Instituto Botânico



SUBSIDIADO PELO
INSTITUTO PARA A ALTA CULTURA

1946

A concessão de subsídios por parte do Instituto para a Alta Cultura não envolve juízo de valor sobre a doutrina contida nas publicações subsidiadas, nem aprovação da forma por que essa doutrina é exposta.

Composição e impressão das Oficinas da Tip. Alcobacense, Lt. — Alcobaça

RAPPORT ENTRE LA DISTRIBUTION DES BACTÉRIES ET LA FLÉTRISSURE, DANS LES PLANTES PARASITÉES PAR LE *CORYNEBACTERIUM SEPEDONICUM* (Spiekermann et Kotthoff) Skaptason et Brukholder (7).

NOTE PRÉLIMINAIRE

par

MATHILDE BENSAUDE

EN parcourant la bibliographie relative à la pourriture annulaire et la flétrissure de la pomme-de-terre (laquelle par inoculation peut se transmettre aux tomatiers) nous avons trouvé des observations difficiles à concilier en ce qui regarde la localisation des parasites. En effet, sur des plantes de pommes-de-terre atteintes de flétrissure, poussant en plein champ, HAASIS observe (1), au moyen de frottis, que les bacteries abondent dans les tubercules mères et dans les parties souterraines des tiges, mais qu'elles se présentent en nombres de plus en plus petits jusqu'à quelques centimètres au dessus du sol et sont absentes de la majeure partie de l'appareil végétatif aérien. SAVILLE et RACICOT (5) au contraire, dans des plantes de pommes-de-terre et des tomatiers cultivés en serre et inoculés avec des bactéries par ponction, pratiquée dans la tige encore jeune, rapportent que: «in every plant examined by the time a leaf showed symptoms of disease it was already quite heavily invaded by bacteria». LARSON et al. (3) et LARSON (4), sur des tomatiers de serre, inoculés dans les mêmes conditions, retrouvent aussi des bactéries dans tous les organes atteints de flétrissure. La plupart des auteurs citent l'un ou l'autre des deux premiers ouvrages ci-dessus, ou laissent dans le vague la question qui nous intéresse, à savoir: les bactéries sont elles toujours présentes dans les organes qui se fanent et se déssèchent, ou bien peuvent-elles agir à distance, en

obstruant les vaisseaux à un niveau inférieur à celui de l'organe fané, ou de quelque autre manière?

Les observations qui suivent jettent quelque clarté sur cette question. Elles ont été réalisées à l'Université de Colombia à New York, où nous avons eu accés aux laboratoires et à la bibliothèque comme «visiting scholar».

Nos remerciements vont tout spécialement au Professeur S. F. Trelease, chef du département de Botanique, et au Professeur J. Karling, directeur du laboratoire de Mycologie. Il nous est encore un agréable devoir de remercier le Dr. C. Carey, professeur de Bacteriologie à Barnard College, auprès de laquelle nous avons trouvé le meilleur accueil, ainsi que le Dr. Robinson, directeur du Jardin Botanique de New York, qui nous a permis de maintenir nos cultures dans ses étuves à 20°. Il nous reste encore à témoigner notre gratitude au Dr. Schultz et au Dr. Bonde qui nous ont fait les honneurs de la Station expérimentale d'Aroostook Farm à Presqu'île, Maine et au Dr. R. H. Larson, de Madison, qui nous a fourni les tubercules infectés, dont nous avons isolé le *Corynebacterium sepedonicum*.

Nos recherches ont porté sur une quarantaine de tomatiers de la variété Bonny Best et sur une vingtaine de plantes de pommes-de-terre de diverses variétés américaines sensibles à la maladie. Ces plantes ont été cultivées en serre à la température la plus favorable à l'apparition rapide de symptomes, entre 23° et 28° C.. Les plantes furent inoculées par ponction de la tige, à travers d'une goutte de culture pure de *C. sepedonicum*. Le plus grand nombre de ces plantes furent inoculées encore fort jeunes, assez près du collet, d'autres déjà agées de 6 à 8 semaines, dans l'extrémité de longues pousses tendres. Huit tomatiers âgés de deux mois furent ponctionnés à peu de centimètres du sol, dans une partie de la tige déjà très dure.

Les observations faites sur le matériel de serre décrit ci-dessus fûrent très heureusement completées par d'autres, effectuées du 5 au 10 Septembre 1944 sur des pommes-de--terre en plein champ à Arroostook Farm, Presqu'Isle, Maine. Les plantes de pommes-de-terre étudiées à Maine

apartenaient à diverses variétés susceptibles, telles que: Green Mountain, Irish Cobbler et Katahdin, ou à des variétés résistantes (récemment créées par le U. S. Department of Agriculture) et provenaient toutes de tubercules coupés en morceaux, dont certains lots avient étés badigeonnés avec la chair de tubercules très fortement atteints de pourriture annulaire. La plantation avait eu lieu à la mi-Mai; vers le commencement de Septembre, les plantes ayant fleuri, étaient encore vertes, mais celles qui provenaient de tubercules inoculés, de variétés sensibles, commençaient à flétrir.

SYMPTOMES DE LA MALADIE

Plantes de serre: Les pommes-de-terre et les tomatiers en serre, inoculés jeunes et près de la base de la tige, montrèrent les premiers signes de flétrissure de 10 à 20 jours après l'inoculation. Les tiges restaient érectes, mais les feuilles se fanaient les unes après les autres, de la ponction, vers l'extrémité de la plante. D'abord le pétiole fléchissait puis certaines folioles devenaient moles et se marbraient de jaune, finalement elles se desséchaient Comme Larson, nous avons observé que chez beaucoup de tomatiers la maladie progresse plus rapidement le long d'un secteur de la tige; ce secteur correspondait dans nos plantes, à celui du point de pénétration de l'aiguille lors de l'inoculation.

Dans les plantes inoculées vers l'extrémité de la tige tendre, la maladie se propageait aussi de bas en haut et également de haut en bas, à partir de l'inoculation. La flétrissure se montrait au niveau des jeunes feuilles. Les feuilles qui étaient déjà grandes lorsque l'inoculation avait été pratiquée et très mûres quelques semaines plus tard, se desséchaient, comme du reste les feuilles inférieures des plantes témoins finissaient par le faire, mais elles ne montraient pas le caractéristique fléchissement du pétiole, que l'on observait sur les organes plus jeunes.

Les tomatiers inoculés dans les tiges mûres ne montraient pas de flétrissure.

Dans les plantes maintenues en serre, un arrêt précoce

de croissance fut observé, sur les tomatiers inoculés jeunes près du collet. Ces plantes d'ailleur ne fleurirent pas, tandis que les témoins produisaient des fleurs. A ce nanisme correspondait un précoce jaunissement et la détérioration succéssive de nombreuses radicelles, d'où un moindre développement du système radiculaire que chez les témoins.

Plantes en plein champ: En comparant les symptômes de la maladie des plantes de serre avec ceux des plantes en plein champ, que nous avons observé en Septembre à Presqu'Isle, deux importantes différences nous frappèrent, à savoir: le temps nécessaire à l'apparition de la flétrissure et le mode dont celle-ci se présente. En serre, comme nous l'avons vu, la flétrissure survint au bout de 10 à 20 jours, dans les champs au contraire elle prit des mois pour se produire et ne commençait à se manifester que vers la fin de la saison. Dans les serres la flétrissure progressait de pétiole en pétiole; la tige, sauf quelquefois tout à fait au bout, restait cependent turgide, même lorsque toutes les feuilles se montraient déjà fanées et déssechées. Dans les champs au contraire, la flétrissure, quand elle se produisit finalement, fut plus au moins soudaine, les tiges se montrèrent flasques, sauf à la base, et se pliaient en arc, puis s'affaissaient sur le sol, souvent encore vertes. Les plantes infectées, à Aroostook Farm étaient aussi bien développées que les témoins et avaient fleuri normalement, ce qui indique que le système radiculaire était resté normal, pendant la plus grande partie de la saison. En Septembre cependant, lorsque nous avons arraché et étudié un certain nombre de plantes avec des symptômes de flétrissures, nous avons trouvé que la plupart des radicelles étaient fanées ou même vidées. Les plantes témoins et celles de variétés résistantes, au contraire, présentaient des racines bien blanches, avec d'abondantes radicelles turgescentes.

MÉTHODE

Pour étudier la distribution des bactéries dans les divers organes des plantes nous avons préparé des coupes fraîches, selon la méthode adoptée par KOEHLER et JONES (2),

dans leur étude de la flétrissure de la luzerne, produite par le *C. insidiosum*. Les plantes fûrent sectionnées de l'extrémité vers la base, pour éviter des montées de sève qui auraient pu se produire autrement, en entraînant les bactéries dans les vaisseaux à un niveau supérieur à celui auquel elles se trouvaient dans les plantes intactes. Une ou plusieurs sections fûrent faites au niveau de chaque entre--noeud, dans la plupart des plantes jusqu'au niveau du collet, pour un certain nombre, jusqu'à l'extrémité de la racine primaire principale, chez les tomatiers, ou d'une des plus grandes racines adventices, chez les pommes-de-terre.

Les coupes fûrent faites avec un microtome de table Spencer, puis immergées dans de l'alcool à 95° pour empécher la diffusion des bactéries et ensuite colorées par une, de plusieurs méthodes de Gram, en usage dans les laboratoires; la contre-coloration à la safranine fût supprimée et les parois cellulosiques teintes avec du vert lumière ou de l'orange G, dans l'huile de girofles. Les préparations fûrent finalement lavées et montées dans de l'huile de girofles fraîche. Pour que ces coupes se conservent pendant un certain temps, il suffit de substituer au bout de 2 à 3 jours, l'huile de girofles par du baume du Canadà. Les bactéries se teignent en bleu indigo, les parois lignifiées prennent un ton bleu clair et les parois cellulosiques sont vertes ou oranges. Lorsque les coupes ne sont pas trop épaisses les bactéries ressortent avec tant de clarté, que l'on peut difficilment manquer de voir, même à grossissement moyen, des individus, en petits groupes, attachés aux parois d'un vase ou logés entre deux cellules.

DISTRIBUTION DES BACTÉRIES DANS LES PLANTES FLÉTRIES

Plantes en plein champ: Nous avons arraché et étudié une quinzaine de plantes, dont nous avons sectionné une ou plusieurs tiges, les unes encore érectes et vertes, d'autres avec, ici et là, quelques petites pousses latérales un peu flasques, aux feuilles marbrées de jaune; aussi des tiges entièrement affaissées. Toutes les plantes exami-

nées, présentaient des bactéries dans la partie de la tige la plus rapprochée du tubercule, jusqu'au niveau du sol ou un peu au dessus. Dans de rares branches latérales, nées bas sur la tige principale, nous avons trouvé des bactéries jusqu'au niveau des tissus jeunes, presque à l'extrémité, mais en général la plus grande partie de la tige au-dessus du sol, ne contenait pas de parasites. Comme Haasis, nous avons observé que les bactéries diminuaient rapidement en nombre à mesure que l'on examinait, dans la tige, des coupes prélevées à plus grande distance du tubercule-mère. Jamais nous n'avons vu une infection générale et encore bien moins, une complète obturation de tous les vaisseaux du bois, à quelque niveau que ce soit, ni même à la base des tiges les plus infectées.

Dans le xylème infecté de la base des tiges, les bactéries s'observaient seulement dans les vaisseaux ponctués, en quelques cas dans les plus jeunes, jamais dans le proto — ou le metaxylème; ceci signifie, comme nous l'expliquerons dans une note ultérieure, que les bactéries étaient remontées des tubercules vers les tiges, quand ces dernières n'étaient plus jeunes, mais au contraire avaient déjà acquis une considérable maturité.

Nous n'avons trouvé des vaisseaux primaires envahis que dans des jeunes branches latérales, nées tardivement à la base de certaines tiges parasitées. Les bactéries étaient peu nombreuses et dans un seul cas, avons nous remarqué une infection initiale du parenchyme du liber interne.

À la base de tiges mûres, nous n'avons jamais observé d'invasion du parenchyme, excepté là où s'était produit, probablement par suite de gel, des fentes dans la partie souterraine de la tige.

Les racines nées le long d'un secteur parasité d'une tige se présentaient elles-même parasitées et toutes celles qui en dérivaient, jusqu'aux radicelles les plus jeunes. Dans les racines avec un xylème secondaire déjà bien développé, les bactéries se trouvaient dans un nombre plus ou moins grand de vaisseaux mûrs, plus abondamment près de la naissance des racines latérales. Entre les vaisseaux infectés et le cambium, il y avait presque toujours une

zone de vaisseaux mûrs et immatures exemptes de bactéries. Les invasions du parenchyme libérien dans ces racines, étaient toujours rares, petites et limitées à la base des racines latérales infectées. Quant aux radicelles, leur état de détérioration n'a pas permis une étude détaillée. Au contraire de ce qui s'était passé avec les racines plus mûres, la présence de bactéries dans les racines très jeunes a amené leur perte de turgéscence et leur nécrose. Jusqu'à quel point ces symptômes avaint-ils été produits par le *C. sepedonicum* et à quel point par l'invasion secondaire de bactéries du sol, il ne nous a pas été possible de déterminer.

C'est à la détérioration de nombreuses radicelles et non à l'obstruction des vaisseaux du xylème des racines ou des tiges, toujours très incomplète, que nous attribuons la soudaine flétrissure des plantes dans les champs.

Plantes de serre. Les tomatiers et les plantes de pommes-de-terre inoculés dans la partie inférieure des tiges, encore petites et tendres, présentaient 4 à 6 semaines plus tard, des bactéries au niveau de toutes les feuilles fanées et souvent au dessus, là où la flétrissure ne se montrait pas encore; un certain nombre de racines, et dans les pommes--de-terre, de stolons, se montraient aussi infectés jusqu'aux extrémités.

Dans les tiges, nous avons souvent observé un nombre plus grande de tubes de xylème libres que de tubes parasités. Dans les pétioles flétris et dans les racines, la proportion de vaisseaux infectés est en général beaucoup plus élevée, mais ici comme ailleurs certains, vaisseaux se montrent libres de parasites et, parmis eux, presque toujours les plus récemment formés.

Lorsque la flétrissure s'était produite dans nos plantes plus rapidement d'un côté de la tige que de l'autre, nous avons vérifié, en étudiant les préparations au microscope, une inégalité dans la distribution des bactéries entre les faisceaux. Cette inégalité ne se rapportait pas toujours au nombre de vaisseaux parasités ou obstrués, mais surtout à la présence, à l'absence, au nombre et à l'extension de cavernes nécrotiques entre le protoxylème et les faisceaux du liber interne, dans le parenchyme libérien. Les feuilles

énervées par des vaisseaux provenant d'un faisceau ligneux caulin, sous lequel l'infection du parenchyme était la plus étendue, étaient toujours celles qui se fanaient le plus vite, et souvent d'un seul côté du rachis. Les nécroses du parenchyme se continuent en effet, de la tige dans les pétioles et de là, dans le rachis, nous avons trouvé toujours plus de cavernes bactériennes dans le parenchyme, du côté du rachis où les folioles se fanaient d'abord.

Dans les plantes inoculées à l'extrémité de tiges tendres les bactéries se sont comportées comme dans les plantes jeunes inoculées à la base, seulement, beaucoup moins d'organismes étaient parvenus jusqu'aux partics souterraines, et aucun symptôme morbide n'était visible dans les racines, au bout de 4 à 6 semaines. Des cavernes dans le parenchyme du liber interne ne fûrent observées que dans les parties relativement jeunes de la tige, et en contact avec des vaisseaux primaires pleins de bactéries. Dans les régions plus mûres de la tige, là où les feuilles ne se montraient pas flétries, quelques vaisseaux sécondaires étaient bien parasités, mais nous n'avons pas vu de cavernes dans le parenchyme.

Dans les tomatiers inoculés à la base des tiges mûres, 4 à 6 semaines plus tard les bactéries étaient remontées de 15 à 20 centimètres, toujours dans les tubes de bois secondaire, et fûrent observées aussi dans les racines, en nombres pas très élevés, de 5 à 10 centimètres en dessous de la piqûre. Comme nous l'avons vu plus haut, jusqu'au moment où ces plantes fûrent sectionnées, aucun symptôme extérieur de la maladie ne s'était manifesté.

Dans nos plantes de serre, les bactéries, tout au contraire de ce que nous avons observé dans les plantes à Aroostook Farm, se trouvaient donc en abondance au niveau de tous les organes fanés. Elles se voyaient non seulement dans une proportion plus ou moins élevée de vaisseaux, mais encore dans des cavernes nécrotiques au sein du parenchyme adjacent à ceux-ci. Il semble exister une relation très nette entre la formation de cavernes bactériennes dans le parenchyme libérien et la flétrissure. Faut-il attribuer la perte de turgescence et le dessèchement des organes à la production intense de toxine au

niveau de ces masses bactériennes? toxine qui provoquerait la plasmolyse des tissus, ou bien doit-on attribuer ce phénomène, tout simplement à une interruption du courrant transpiratoire, provoquée par la destruction des parois des cellules du parenchyme, parois où s'effectuait possiblement la partie sub-microscopique de ce courrant? (8). Seules des recherches ultérieures pourront nous éclairer à ce sujet.

CONCLUSIONS

Des observations que nous avons faites on peut conclure que, selon les conditions ambiantes, les bactéries se développent seulement dans les organes souterrains des plantes ou bien dans tout l'appareil végétatif.

Comme quelques expériences de Sherf (6) l'indiquaient déjà, l'invasion prédominante des organes souterrains semble se produire quand la température reste relativement basse et la montée dans les organes aériens se produit lorsque la température est plus élevés.

La flétrissure telle que Haasis (1) l'a décrit et que nous l'avons observée à Presqu'île, provient apparemment de la destruction des radicelles en grand nombre, sans que les bactéries se trouvent en général dans les organes flétris. La flétrissure telle que Saville et Racicot (5), Larson et al. (3), Larson (4) et nous même l'avons observée dans des plantes de serre, inoculées par ponction, ne se produit que dans des organes parasités et provient apparemment de toxines sécrétées par les bactéries ou de la destruction de tissus libériens au niveau même des organes qui se fanent. Il s'agit en somme de deux maladies différentes.

Lorsque les bactéries envahissent des tiges ou des racines qui présentent déjà un xylème secondaire bien développé, elles ne sortent guère des vaissaux ponctués et du parenchyme secondaire, aucune caverne nécrotique ne se produit dans le parenchyme du liber et aucun symptome extérieur de la maladie n'apparaît.

Existe-t'il quelque relation entre la formation de cavernes bactériennes à la base des radicelles et leur perte

de turgescence? Des cavernes nécrotiques se produisent-elles dans le parenchyme qui entoure les vaisseaux infectés dans les radicelles, et la présence de ces cavernes précède-t'elle la flétrissure de ces organes, comme celà s'observe pour les feuilles? Voici autant de questions auxquelles nous ne pourrions répondre, étant donné qu'il est difficile de suivre la marche de la maladie dans des radicelles croissant sous terre. Ce qui est certain c'est que les radicelles produites par des racines parasitées se sont montrées flasques et souvent réduites à une pellicule en forme de tuyau. A quel point cet aspect résulte de la détérioration produite par le *C. sepedonicum*, et combien à l'invasion d'organismes secondaires, seul pourrait le démontrer l'étude de plantes inoculées, dont les racines seraient maintenues dans un liquide nutritif aceptique.

Mai, 1945.

BIBLIOGRAPHIE

(1) HAASIS, F. W.
1940 The distribution of *Phytomonas sepedonoica* in potato seed-pieces, plants and tubers, and its significance. *California Dept. Agr. Bul.* 29: 16-20, fig. 1-4.

(2) KOEHLER, B and JONES, F. R.
1932 Alfalfa wilt as influenced by soil temperature and soil moisture. *Illinois Agr. Exp. Sta. Bul.* 378: 39-79, fig. 1-18.

(3) LARSON, R. H., WALKER, J. C. and FOGELBERG, S. O.
1941 Bacterial ring-rot in relation to the tomato. *Abstr. Phytopath.* 31: 14-15.

(4) LARSON, R. H.
The ring-rot bacterium in relation to tomato and eggplant. *Journ. Agr. Res.* 69: 309-325, fig. 1-6.

(5) SAVILLE, D. B. O. and RACICOT, H. N.
1937 Bacterial wilt and rot of potatoes. *Sci. Agri.* 17: 518-522, fig. 1.

(6) SHERF, A. F.
1944 Infection expériments with potato ring-rot and the effect of soil temperature on the disease. *Amer. pot. journ.* 21: 27-30.

(7) SKAPTASON, J. B. and BURKHOLDER, W. H.
1942 Classification and nomenclature of the pathogen causing bacterial ring-rot of potatoes. *Phytopath.* 32: 439-441.

(8) STRUGGER, SIEGFRIED
1939 Die Lumineszensmikroskopische Analyse des Transpirationsstromes in Parenchymen. *Biol. Zentrbl.* 59: 409-442, 19 figs.,

MULTIPLICATION ET MIGRATION DU *CORYNEBACTERIUM SEPEDONICUM* DANS LES TISSUS DES PLANTES INFECTÉES

NOTE PRÉLIMINAIRE

par

MATHILDE BENSAUDE

AU cours d'une étude sur la distribution des bactéries et l'apparition de la flétrissure chez les plantes de pommes-de-terre et les tomatiers envahis par le *C. sepedonicum*, nous avons eu l'occasion d'observer des faits que nous croyons inédits, sur les rapports intimes entre hôte et pathogène, lesquels font l'objet de la présente note.

Tous les auteurs qui ont étudié des coupes de tubercules et de tiges envahies par le *C. sepedonicum* sont d'accord sur le caractère prédominamment vasculaire de l'infection. Dans les tubercules cependant, il est fréquent de voir, comme l'ont rapporté STAPP (11, p. 794), SAVILLE et RACICOT (9, p. 518-522) et autres, que les bactéries sortent ici et là de l'intérieur des tubes du xylème, pour pénétrer dans le parenchyme contigu. En sens centripétal, les bactéries progressent dans les espaces intercellulaires du parenchyme, éventuellement jusqu'au centre même de la moëlle; en sens inverse, STAPP a fait remarquer que l'invasion ne dépasse guère les limites du parenchyme du liber externe (11, p. 818-819).

Dans les tiges de pommes-de-terre, inoculées par ponction, les sorties de bactéries de l'intérieur des vaisseaux vers les espaces intercellulaires du parenchyme seraient

---

Les recherches rapportées dons cette note ont été commencées à l'Université de Colombia, dans le Laboratoire de Mycologie et terminées à Lisbonne, dans le Laboratoire de Cytologie de la Faculté de Médicine, où le Professeur CELESTINO DA COSTA et ses assistants nous ont rendu le travail facile et agréable; à tous nos meilleurs remerciements.

rares, d'après Stapp et se produiraient à petite distance de la piqûre de l'aiguille (11, p. 793). Larson et *al* (7) et Larson (8), qui ont étudié, avec plus de détails que leur prédécesseurs l'histopathologie de la maladie chez les tomatiers, ont trouvé eux aussi, que dans des plantes inoculées par ponction et maintenues en serre à la température de 24° à 28° C.: «Bacteria were found in the vessels from where they penetrate into the intercellular spaces of pith and cortex» et ailleurs «Seldom were bacteria found in the parenchymatous tissue adjacent to invaded xylem, except following tissue rupture near the point of inoculation *, or at points in the invaded stem where xylem vessels became thickly populated with bacteria and enzymatic dissolution of the thinner weaker-walled xylem cells took place» (8). Dans le même travail Larson poursuit: «Systemic invasion of the stem tissue of the tomato occurred largely in the spiral and annular vessels; the adjacent pitted vessels were less frequently invaded. Immature xylem and cells of the cambium were only occasionally infected. The outer and inner phloem were only rarely invaded by bacteria except in complete breakdown of the vascular tissue». Kreutzer et Mc Lean (6) semblent avoir observé beaucoup plus fréquemment que les auteurs cités, des invasions du parenchyme, souvent en des régions éloignées du point d'inoculation, parfois jusqu'aux tissus méristématiques à l'extrémité de la tige.

Larson illustre (8, p. 1-2, A) et décrit comment se produisent, par la destruction de parois cellulaires dans le parenchyme envahi par les bactéries, des cavités remplies d'organismes, et ajoute: «The bacteria progress only slightly from the parenchyma cavities into the surrounding intercellular spaces».

Les citations précédentes résument à peu près ce que les auteurs rapportaient sur les relations entre le *C. sepedonicum* et les plantes parasitées, lorsque nous avons entrepris notre étude.

---

* Déjà Spiekermann et Kotthoff, cités par Stapp, (14, p. 816-817) ont rapporté des observations analogues pour les tiges de pommes-de-terre.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Dans une note antérieure, à laquelle nous renvoyons le lecteur (1) nous avons décrit en détail, le matériel dont nous disposions, ainsi que la méthode que nous avons suivie pour préparer des coupes, non préalablement fixées. Les observations faites sur les sections fraiches ont été postérieurement complétées par l'étude d'un nombre de tomatiers inoculés, dont des fragments des tiges, pétioles et racines ont été fixés, 4 à 6 semaines plus tard et inclus dans la paraffine, coupés en sections de 5 à 20 microns d'épaisseur, selon les tissus, soigneusement orientées et sériées. Les coupes longitudinales sont particulièrement instructives.

Le matériel fixée avec un mélange d'alcool-acétique et de formol fût coloré par la méthode triple de Flemming, dans laquelle la solution au violet de gentiane avait été substituée par la solution de Hucker, suivie d'un bain de Lugol, ce qui a permis de colorer électivement les bactéries, fortement gram-positives, comme tous les *Corynebacterium.*

RELATIONS DES BACTÉRIES AVEC LES DIVERS TISSUS DE L'HÔTE

Au niveau de l'inoculation on trouve des bactéries entre les céllules subérifiées, qui se sont formées dans la cicatrice de la piqûre, et partout où une cellule a été touchée lors de la ponction, ainsi que dans tous les interstices où le suc cellulaire extraverti s'est infiltré. À quelques centimètres au dessus et au dessous de l'inoculation, les bactéries sont encore présentes dans la moëlle, surtout dans les grands espaces intercellulaires qui, dans ce tissus, existent là où les cellules se joignent. Ailleurs, à tout autre niveau, 4 à 6 semaines après l'inoculation, les bactéries ne se retrouvent que dans la lumière des tubes conducteurs du bois, dans les parois de ceux-ci et dans les parois cellulaires et les espaces intercellulaires (lorsqu'ils existent) du parenchyme qui entoure les vaisseaux parasités; parfois aussi l'infec-

tion s'étend aux éléments libériens les plus rapprochés du xyléme infecté.

Invasion élective des vaisseux du xylème selon leur âge: une étude comparée de tiges parasitées, coupées à différents niveaux, ainsi que de tiges inoculées, les unes dans des tissus durs et d'autres dans des tissus tendres, montre clairement, que selon l'âge du bois au moment où les bactéries y pénètrent et selon la maturité acquise par celui-ci, depuis ce moment jusqu'à celui où les sections sont préparées, les bactéries se présentent dans des vaisseaux du protoxylème, du métaxylème, ou dans des vaisseaux secondaires. Parfois aussi, des organismes sont présents dans quelques tubes de toutes ces formations.

Pour fixer les idées, prenons un exemple concret: un tomatier Bonny Best, cultivé en pot et maintenu dans une serre à 23°-28° C., a été inoculé lorsqu'il avait 10 à 12 centimètres de haut. L'inoculation a été faite par piqûre à travers une goutte de culture pure et virulente de *C. sepedonicum*, à 6 centimètres au dessus du niveau du sol, dans une partie encore tendre de la jeune tige. Lorsque 4 à 6 semaines plus tard, on examine une coupe prélevée à quelque distance au dessus de la cicatrice, région qui a été envahie par les bactéries lorsque les tissus étaient encore très jeunes, mais qui depuis lors s'est considérablement développée et présente des tubes de métaxylème et plusieurs rangées de vaisseaux ponctués, on trouve des bactéries dans un certain nombre de vaisseaux primaires d'âges divers et dans un nombre de vaisseux ponctués des plus anciennement formés. Si on examine des sections prélevées à des niveaux supérieurs à celui de la première coupe, et de plus en plus rapprochés de l'extrémité de la plante, on remarquera que la présence de bactéries se limite de plus en plus aux tubes les plus âgés. Lorsqu'on examine finalement une région très jeune, où les quelques vaisseaux de protoxylème qui se sont déjà différenciés ne sont pas encore complètement lignifiés, on ne trouvera plus de bacteries dans le xylème. Au contraire, si on examine des coupes prises en dessous de la première, dans des parties de plus

en plus âgées de la tige, on remarquera que l'infection se déplace graduellement en sens centrifuge: d'abord les vaisseaux primaires les plus âgés cessent d'être parasités, puis tout le xylème primaire se montre libre, plus bas encore, seuls les tubes ponctués moyens se montrent envahis en nombre plus ou moins grand, et finalement, à la base de la plante, près du collet, seulement les vaisseaux les plus jeunes se montrent parasités. Des observations analogues, faites sur un nombre élevé de tiges, nous ont convaincu que les vaisseaux d'âge moyen sont ceux dans lesquels pénètrent et se multiplient les bactéries parasites.

L'immunité des vaisseaux très jeunes nous a été démontrée très clairement par ce qui suit: nous avons inoculé une douzaine de plantes, en coupant sur chacune un pétiole jeune avec un scapel, à travers d'une goute de culture pure de *C. sepedonicum*. Quelques semaines plus tard, sur des coupes prélevées au niveau de la base du pétiole coupé et plus bas, nous avons pu suivre la descente des bactéries du petiole jusqu'aux faisceaux caulins. Or, dans tous les cas observés, les bactéries, quoique présentes en grande abondance sur toute la surface coupée du pétiole, n'avaient pénétré que dans les tubes du xylème les plus mûrs et seuls les quelques vaisseaux annelés du faisceau caulin qui leur correspondaient, se trouvaient infectés. Les bactérie n'avaiente pas pénétré dans les vaisseaux immatures.

Pour vérifier s'il existe quelque rapport entre le fonctionnement des vaisseaux et la multiplication des bactéries dans leur lumière nous, avons procédé à l'expérience suivante: des tomatiers non-inoculés, qui avaient servi de témoins, furent déracinés et lavés, puis immergés jusqu'au collet dans une solution acqueuse de vert lumière à 1 % (3) et coupés sous le liquide. Vingt quatre heures plus tard nous avons retiré et sectionné les tiges et avons examiné les coupes À tous les niveaux, sauf tout à fait à la base, où seuls les vaisseaux secondaires, les plus jeunes, se sont teints, nous avons trouvé, qu'avec fort peu dexceptions, l'absorption se faisait par les tubes d'âge moyen. Les vaisseaux les plus jeunes, à presque tous les

niveaux, les plus vieux, dans les parties très mûres de la tige, restaient incolores.

Cette première expérience indiquait déjà que les tubes envahis par les bactéries sont probablement ceux qui se trouvent en état fonctionnel. Une seconde expérience fut encore plus élucidative: nous avons traité de la même manière et coupé sous la solution de vert-lumière, plusieurs tomatiers, qui avaient été inoculés cinq semaines auparavant; au bout de 24 heures, nous avons préparé des coupes, non préalablement fixées de differents niveaux des tiges et les avons inmmergées dans de l'alcool à 95°, puis colorées, selon la méthode de Koehler et Jones (5), par le Gram suivi d'orange G. La solution de vert lumière n'a pas été déplacée par le violet ni l'orange G., de sorte qu'il nous a été facile de distinguer à la fois les tubes fonctionnels, de ceux qui n'avaient pas absorbé de vert-lumière et de localiser les bactéries. Nous avons trouvé que les tubes non lignifiés et les plus jeunes lignifiés, ne présentaient pas de bactéries et n'absorbaient pas de vert, que les tubes d'âge moyen avaient absorbé de la teinture et que parmi ceux-ci, les plus récemment formés étaient encore libres de parasites, ou montraient à peine quelques bactéries à l'entrée de rares ponctuations; les vaisseaux moyens un peu plus âgés étaient par contre, pour la plupart, très envahis. Certains vaisseaux du protoxylème, qui avaient été évidemment parasités les premiers et qui à l'heure où les plantes furent immergées dans le teinture se trouvaient complètement obstrués par des tyloses et des masses de bactéries, étaient les seuls tubes parasités qui n'avaient pas absorbé de teinture.

Tout indique donc que les vaisseaux non fonctionnels ne sont pas envahis par les bactéries et que celles-ci pénètrent, au contraire, dans les tubes qui absorbent. Par suite de la multiplication lente des bactéries les vaisseaux fonctionnels ne sont pas obstrués rapidement, mais bien au contraire fort lentement, ce qui donne le temps à d'autres tubes de mûrir et de devenir fonctionnels à mesure que les plus anciens sont envahis. Il est difficile, dans ces circonstances, d'attribuer la flétrissure à l'arrêt total de montée de la sève par obturation des vaisseaux, du moins

dans une tige qui s'accroit encore en diamètre et où de nouveaux vaisseaux deviennent sucessivement fonctionnels.

Dans les pétioles des feuilles, nous avons souvent trouvé que tous les vaisseaux, excepté quelques uns des plus jeunes, étaient remplis de bactéries, dans un, plusieurs, ou même tous les faisceaux. Nous avons remarqué toutefois que malgré la masse de bactéries, la teinture verte montait encore dans les tubes parasités, quoique plus lentement que dans les vaisseaux libres. Seuls les vaisseaux de pétioles de feuilles déjà fanées n'absorbaient plus de teinture. Il semblerait donc que la flétrissure soit plutôt la cause de l'arrêt de l'absorption par les vaisseaux du xylème, que la conséquence de cet arrêt.

Multiplication des bactéries dans les vaisseaux: La lignification des parois des vaisseaux commence au centre comme on le sait, laissant à l'extérieur et à l'intérieur, une zone cellulosique non lignifiée, ou primaire, qui va en s'amincissant avec l'épaississement de la partie lignifiée. La zone non-lignifiée à l'intérieur des vaisseaux, nous la dénominerons membrane interne et celle à l'extérieur, juxtaposée à la lamelle moyenne qui sépare la paroi du vaisseau de celles des cellules contigues, nous la dénominerons membrane primaire externe. Dans les parties non lignifiées de la paroi, entre les anneaux ou les spirales des vaisseaux du protoxylème, au niveau des ouvertures scalariformes des vaisseaux du métaxylème et des ponctuations des tubes secondaires, les deux membranes primaires, l'externe et l'interne, ne forment plus qu'une seule.

Les bactéries se multiplient dans l'intérieur des vaisseaux contre la membrane cellulosique, d'abord entre les sculptures et plus tard au niveau de celles-ci. Dans les recoins, tels que les rainures entre les spirales, dans les vestibules des ponctuations et dans les espaces compris entre les tyloses, ou entre celles-ci et les parois des vaisseaux, la multiplication est particulièrement active.

Mouvement vertical et radial des bactéries dans le bois: Comme nous l'avons vu dans une note antérieure (1), les bactéries montent et descendent dans les plantes infectées;

dans celles qui sont maintenues à une température de 23-28° C., le mouvement dans les deux sens se fait, selon nos observations, à peu près avec la même rapidité. Comme les bactéries se trouvent principalement dans les tubes vasculaires, cette observation indique que le mouvement de la sève ne joue pas un rôle direct prépondérant dans le transport vertical des organismes. Là où il se présente une paroi transversale, nous savons qu'elle est transposée par les parasites; par analogie avec ce que nous verrons ailleurs, nous supposons que le passage se fait au niveau des ponctuations de la paroi transversale, mais nous n'avons pas eu l'occasion de vérifier ce point.

Le fait qu'à differents niveaux ce sont, ou bien les vaisseaux du protoxylème, du métaxylème, ou ceux du bois secondaire qui se présentent infectés, prouve suffisamment que les bactéries ne se meuvent pas seulement verticalement dans la lumière des vaisseaux, mais aussi radialement à travers les parenchymes et de vaisseaux en vaisseaux. En descendant, les bactéries passent des vaisseaux plus âgés vers les plus jeunes, en remontant, des plus jeunes vers les plus âgés. Comment se fait ce mouvement transversal?

L'examen de coupes à la paraffine, prélevées dans une région de la tige où les bactéries ont pénétré de bonne heure et où, en conséquence, les vaisseaux du protoxylème se trouvent infectés, mais, la maturation s'étant produite postérieurement, les vaisseaux du métaxylème et même de nombreux tubes secondaires ont été parasités successivement, montre comment ce mouvement transversal s'effectue. Les vaisseaux spiralés sont souvent ceux qui se présentent les plus infectés. Les bactéries forment une masse dense entre les tyloses (nombreuses et précoces, soit dit en passant, dans les plantes parasitées par le *C. sepedonicum)* et dans les rainures entre les tours consécutifs de la spirale lignifiée. Sur les coupes longitudinales les rainures apparaissent comme de petits culs-de-sac; ici et là au niveau d'un de ceux-ci, on voit comment les bactéries sortent du tube. En certains de ces points de sortie, les bactéries, peu nombreuses encore, se voient individuellement entre la paroi du vaisseau (à ce niveau constitué par une

seule couche cellulosique) et la lamelle moyenne qui sépare celle-ci de la paroi d'éléments contigus. En général cependant les bactéries, déjà beaucoup plus nombreuses, se présentent en masse dans la lamelle moyenne, et obscurcissent les limites de la paroi, de sorte qu'il este difficile de dire au juste où elles se trouvent logées.

Lorsque les bactéries sortent d'un tube spiralé entouré de parenchyme, par le fond d'un cul-de-sac en contact avec deux cellules parenchymateuses du liber interne, ce qui est très fréquent, on les voit, s'étant multipliées dans l'épaisseur de la lamelle moyenne, qui sépare le vaisseau des cellules, continuer leur chemin en faisant un angle, et pénétrer entre les deux cellules en question.

La sortie de bactéries des vaisseaux annelés ou spiralés et la pénétration entre les cellules du parenchyme du xylème primaire ou du liber interne (ce qui est le même tissu dans la tomate et dans la pomme-de-terre comme dans le tabac, 2. p. 373-374) constitue le début d'infections du parenchyme, souvent très étendues, dont nous parlerons plus loin.

Lorsque les bactéries, s'étant multipliées entre les cellules du parenchyme, prennent contact avec un nouveau vaisseau, celui-ci est envahi. Il y a multiplication des organismes le long de la membrane primaire externe de la paroi du tube et pénétration au niveau de parties non lignifiées de cette paroi, entre les anneaux ou les tours de la spirale.

A mesure que les bactéries s'éloignent du liber interne et pénètrent plus avant, en sens centrifuge, dans un des grands faisceaux mûrissants d'une tige de tomates ou de pommes-de-terre et arrivent aux vaisseaux primaires differenciés en dernier lieu, ou aux vaisseaux secondaires, elles trouvent de moins en moins de parenchyme interposé entre les trachées et les tracheides, de sorte que le passage des organismes se fait le plus souvent directement de tube en tube. D'abord, il y a transposition de la paroi du vaisseau dont les bactéries sortent, au niveau d'une aire non lignifiée, puis multiplication entre cette paroi et la lamelle moyenne, ensuite pénétration de cette dernière et enfin de la paroi du nouveau vaisseau (entre les sculptures) puis

multiplication dans le tube nouvellement envahi. L'examen d'une coupe longitudinale d'un faisceau, dans lequel l'infection est déjà avancée dans les vaisseaux les plus âgés, assez intense dans les vaisseaux d'âge moyen, tandis que les vaisseaux les plus jeunes commencent à peine à être infectés, montre clairement les différentes phases que nous venons de décrire.

Là, où deux vaisseaux spiralés sont en contact l'un avec l'autre, ou avec un vaisseau scalariforme, les parties non--lignifiées se juxtaposent, ce qui doit beaucoup faciliter le passage des bactéries d'un tube à l'autre.

Les bactéries dans leur marche radiale centrifuge arrivent finalement au bois secondaire, constitué chez la tomate et la pomme-de-terre par des tubes ponctués aréolés. A l'endroit où deux tubes aréolés entrent en contact l'un avec l'autre, les ponctuations se trouvent exactement au même niveau et les vestibules se joignent, comme deux verres de montre, bord à bord et constituent ensemble une chambre à contours circulaires sur une coupe parallèle à la paroi examinée et lenticulaire, sur une coupe perpendiculaire à celle-ci. La membrane, qui sépare les deux moitiés de la chambre ne porte pas de tore dans les plantes qui nous intéressent. Les bactéries commencent par revêtir la chambre de la ponctuation du côté du vaisseau d'où elles sortent et puis, en transposant la très fine lamelle, elles passent à la chambre contigüe, s'y multiplient et finissent par remplir totalement les deux moitiés. Lorsque on examine une coupe transversale épaisse d'une tige, comme le sont toujours celles du matériel non inclus, et que l'on varie la mise-au-point du microscope, on voit apparaître et disparaître dans l'épaisseur des parois infectées, entre vaisseaux contigus, une série de pastilles bleues à coupe transversale lenticulaire, qui sont tout simplement les vestibules remplis de bactéries Gram-positives. Sur une coupe à la paraffine, suffisamment mince, les ouvertures des ponctuations, vues de l'intérieur d'un tube coupé longitudinalement, apparaissent comme des cercles pointillés, là ou les vestibules des ponctuations sont à peine recouverts de bactéries et comme des pois indigo, là où les

vestibules sont pleins et les canalicules des ponctuations obstruées.

On observe souvent à la limite extérieure de l'infection, dans le bois secondaire, que les bactéries avancent plus rapidement dans les parois que dans les vaisseaux eux--mêmes, de sorte qu'il existe une zone périphérique dans les sections longitudinales, où la plupart des chambres des ponctuations aréolés sont envahies, tandis que la lumière des vaisseaux ne le sont pas encore.

Les bactéries qui ont envahi les ponctuations continuent à se multiplier et finissent par pénétrer dans la lumière du vaisseau dans lequel elles font saillie sous forme de petits pompons. Toutes les chambres des ponctuations de la paroi d'un vaisseau ne sont, en général pas envahis on même temps et quand elles le sont on n'observe pas la multiplication de bactéries à l'entrée de tous les canalicules.

Les vaisseaux secondaires en général ne se montrent pas aussi pleins de bactéries que les vaisseaux annelés et spiralés; lorsque la lumière d'un de ceux-ci est entièrement obstruée il s'agit le plus souvent de trachéïdes assez étroites intercalées entre des trachées beaucoup plus larges.

Nous avons trouvé des vaisseaux parasités dans lesquels les bactéries ne s'etaient pas multipliées entre les sculptures, ou au niveau des ponctuations, mais contre la membrane cellulosique interne au niveau des parties lignifiées. Il est possible que cette localisation indique que les vaisseaux en question n'avaient pas été envahis de l'extérieur à travers les parois, mais par des bactéries venues d'un autre niveau, de l'intérieur du même tube.

Notons que malgré le grand nombre de sections transversales et longitudinales que nous avons étudiées, à l'aide de forts grossissements, jamais nous avons observé, excepté pour quelques éléments primaires inclus dans des cavernes nécrotiques du parenchyme, trace de rupture ou de dissolution des parois des vaisseaux ligneux. Il semble donc que les bactéries traversent les parois de ces formations sans les altérer. Il est à présumer que les bactéries traversent les parois une à une et jamais en masse ou zooglée.

Entre parois contigues de vaisseaux on n'observe pas

d'altération de la lamelle moyenne sous l'influence des bactéries et celles-ci ne produisent pas d'écartement des cellules; d'abord parce-que les parois lignifiées ne se déforment pas facilement et puis parce-que les bactéries, excepté dans les chambres des ponctuations, restent peu nombreuse, ne formant guère qu'une fine rangée de bâtonnets de part et d'autre de la lamelle moyenne ou dans l'épaisseur de celle-ci.

Multiplication des batéries dans le parenchyme: Nous avons vu comment les bactéries sortent des vaisseaux primaires et pénètrent entre les cellules du parenchyme du liber interne. Là où les bactéries sont encore peu nombreuses, comme par exemple à l'extremité de la masse en forme de coin ou de biseau, qui s'introduit d'abord entre parois encore indemnes de cellules contigues, on arrive parfois à distinguer, sur des coupes particulièrement minces et favorables, qu'elles avancent entre la paroi et la lamelle moyenne et seulement plus en arrière pénètrent dans la lamelle proprement dite. Si les cellules sont séparées par des espaces intercellulaires, les bactéries les envahissent, autrement elles se multiplient dans la lamelle moyenne qui finit par s'altérer; le résultat est le même: un écartement des cellules qui se déforment sous la pression des bactéries, leur parois n'étant pas rigides.

Les bactéries se multiplient parfois tellement dans le parenchyme, que les cellules sont séparées les unes des autres comme des îles dans une mer de bâtonnets. Dans les aires d'invasion plus récente, les bactéries ne se trouvent qu'entre les cellules, ou attachées extérieurement à leurs parois; dans les régions plus anciennement envahies, les parois cellulaires elles mêmes sont finalement détruites, probablement par l'action enzymatique des masses d'organismes. Il se forme ainsi des cavernes très étendues où les vaisseaux annelés ou spiralés restent souvent seuls intacts, du moins dans leur parties lignifiées. A partir de ces cavernes, les bactéries envahissent très souvent un nombre élevé de faisceaux libériens et pénètrent entre les tubes criblés et les cellules annexes en dissolvant la lamelle moyenne (voir la belle photographie de Larson (7, pl. 3,

fig. D)). Les tubes criblés eux mêmes, sont finalement envahis et on voit des bactéries sur les restes de mucilage et aussi autour des noyaux, plus ou moins altérés, des cellules annexes.

En contact avec le parenchyme du liber interne parasité, le parenchyme de la moëlle s'infecte parfois aussi. On trouve les bactéries logées dans les fines parois des cellules et surtout dans les espaces intercellulaires qui, dans ce tissu, sont très grands. La destruction de parois cellulaires et la formation de cavernes est cependant rare et limitée dans le parenchyme médullaire, proprement dit. Certains affirment le contraire, mais il nous semble probable qu'ils n'ont pas toujours distingué entre le parenchyme de la moëlle et celui du liber interne. Du reste, ces deux tissus passent graduellement l'un dans l'autre par l'intermédiare de cellules qui, du côté de la moëlle ont déjà tous les caractères de celle-ci et qui de l'autre côté, présentent des parois plus épaissies aux coins et avec des espaces intercellulaires beaucoup plus réduits, ou totalement absents.

Entre les cellules du parenchyme du bois secondaire et les vaisseaux contigus, les bactéries s'observent souvent; elles ne forment qu'une fine ligne, excepté au niveau des ponctuations ou elles s'accumulent dans la chambre unique qui existe du côté du vaisseau. Entre deux cellules du parenchyme secondaire, les bactéries se faufilent aussi en petits nombres, mais seulement à proximité des vaisseaux fonctionnels. Dans les rayons médullaires et dans le bois secondaire interfasciculaire qui, dans la tomate, ne contiennent pas d'éléments conducteurs, on ne trouve guère de bactéries.

Les racines ne présentent ni moëlle ni liber interne, mais dans les tomatiers de la variété Bonny Best, plantes chez lesquelles nous avons étudié en détail la multiplication de *C. sepedonicum* dans les racines, il se forme une fausse moëlle par la prolifération du méristème fondamental; les deux faisceaux ligneux primaires sont disloqués et divisés en quatre groupes. Il est frappant de voir que cette fausse moë le, caractérisée par des cellules de dimensions irregulières, à parois minces et sans espaces intercel-

lulaires, n'est jamais envahie par les bactéries, quoiqu'elle se trouve en contact immédiat avec des vaisseaux primaires parasités, qui doivent rester fonctionnels bien longtemps, puisque l'on voit s'aboucher avec eux les vaisseaux de radicelles d'âges différents, quelques unes si jeunes que seuls peu de tubes se montrent déjà différenciés jusqu'à leur base. Sur nos préparations, ces vaisseaux primaires de la racine principale se sont montrés souvent très remplis de bactéries, et ici et là, on voit clairement comment une véritable petite zooglée, sortie de l'un deux, pénètre dans un tube correspondant d'une radicelle.

Dans le parenchyme du phloème, entre le bois et l'écorce, ils se forment des cavernes comme dans le liber interne des tiges, mais beaucoup plus limitées. Nous avons observé de ces aires nécrotiques seulement à la base des radicelles là où la jeune racine qui émergeait était en contact direct avec le parenchyme libérien de la racine--mère, et où les vaisseaux infectés de la radicelle étaient séparés, à peine par quelques cellules non lignifiées de ce tissu.

Larson *et al* (7) rapportent, comme nous l'avons vu plus haut: «the bacteria progress principally through the xylem vessels and thence intercellularly into the parenchyma of pith and cortex». Cette observation a été répétée par d'autres en particulier par Kreutzer et McLean (6). Or, à notre avis, les parenchymes de la moëlle et du cortex ne sont pas des plus favorables au développement intercellulaire des bactéries. Dans le parenchyme de la moëlle on ne voit guère d'invasion extensive, excepté au niveau de la pénétration de l'aiguille, en conctact avec des fentes produites par le gel à la base des racines et des tiges, ou encore, près d'une aire d'infection très intense du parenchyme du liber interne. Quant au parenchyme de l'écorce nous ne l'avons jamais vu infecté, excepté au niveau de l'inoculation, ou tout près, là où une infiltration de suc cellulaire extraverti, mêlé à de l'inoculum a dû se produire, entre les cellules; aussi à l'endroit oû une racine infectée avait déchiré ce tissus pour arriver à l'extérieur.

Nous avons tâché à plusieurs reprises, mais avec peu de

succès, d'infecter des germes de pomme-de-terre, encore attachés aux tubercules, à travers l'écorce, en enlevant des lanières d'épiderme sous une suspension de *C. sepedonicum.* Nous avons trouvé que quelques bactéries pénétraient bien entre les cellules corticales et nous en avons vu aussi, en faisant des coupes deux semaines après l'inoculation, dans les espaces inter-cellulaires en dessous du callus qui s'est bientôt formé sur la partie pelée. Les organismes cependant ne se présentaient plus comme des bâtonnets, mais arrondis et se coloraient peu par le Gram. Jamais nous n'avons vu les organismes se multiplier abondamment et pénétrer plus avant que l'endoderme. Par contre, il nous a été facile d'obtenir l'infection des germes de pommes-de--terre en coupant, sous la suspension, quelques ébauches radiculaires. Les bactéries pénétrèrent dans les vaisseaux exposés et arrivèrent jusqu'aux faisceaux correspondants de la tige.

De ce qui précède, on voit que les parenchymes les plus favorables à la multiplication des bactéries, les seuls même dans lesquels se produit une invasion spontanée, sont les parenchymes du liber et du xylème. Il s'agit de tissus soit sans interstices intercellullaires (parenchyme lignifie du bois secondaire) ou bien avec de petits espaces intercellulaires, remplis de solution de matières organiques particulièrement diffusibles, bien différents de ceux du parenchyme du cortex, normalement remplis d'air (2 ,p. 392).

Néamoins, même dans ces parenchymes favorables, on n'observe de pénétration spontanée de bactéries et d'active multiplication, que lorsqu'ils sont en contact, plus ou moins direct, avec des vaisseaux fonctionnels du xylème. Dans le parenchyme du liber interne de la tige, par exemple, l'invasion par les bactéries cesse de se produire, dès que le bois secondaire est bien développé et que la sève brute ne monte probablement plus par les vaisseaux spiralés, mais passe à plus grande distance. Il semblerait donc, que malgré la richesse de la solution qui baigne les cellules de ces parenchymes, il faut encore que leur parois soient imbibées de sève brute, pour que les bactéries s'y developpent activement. Doit-on admetre que la sève brute fournit des éléments

minéraux, autrement absents ou insuffisants, sans lesquels le *Corynebacterium sepedonicum* ne saurait se developper? Cette hypothèse est admissible *a priori* étant donné l'éxigence en éléments minéraux de l'organisme qui nous intérèsse, laquelle a été mise en évidence dans le beau travail de Skaptason (12).

REMARQUES FINALES

Il nous reste à appeler l'attention sur l'extraordinaire analogie qui existe entre l'histopathologie de la flétrissure produite dans la pomme-de-terre et la tomate par le *Corynebacterium sepedonicum* et la flétrissure de la luzerne, produite par le *Corynebacterium insidiosum* L. McC., qui a été si bien étudiée par Jones et par Koehler et Jones (4 et 5).

Les ressemblances entre les deux maladies sont inombrables, les différences attribuables plutôt à la diversité de structure et de réaction des plantes hospitalières, qu'à des différences entre les deux *Corynebacterium*. La flétrissure se produit probablement plus vite et avec une moindre infection chez les plantes attaquées par le *C. insidiosum*, par le fait que dans celles-ci la présence des parasites provoque la formation de gomme dans les vaisseaux, laquelle contribue beaucoupe à leur obstruction, tandis que rien de pareil n'a été observé comme réaction à la présence du *Corynebacterium sepedonicum* dans les tiges de pommes--de-terre ou de tomatiers, ni dans les racines de cette dernière plante.

Mai, de 1945.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Bensaude, Mathilde
1946 Rapport entre la distribution des bactéries, et la flétrissure, dans les plantes parasitées par le *Corynebacterium sepedonicum* (Spiekermann et Kotthof) Skaptason et Burkholder. *Bol. Soc. Brot.* **20**: 5-15.

(2) Esau, Katherine
1938 Ontogeny and structure of tobacco phloem. *Hilgardia*, **11**: 343-406.

(3) HARVEY, R. B.
1930 Tracing the transpiration stream with dyes. *Amer. Journ. Bot.* **37**: 657-661.

(4) JONES, F. R.
1928 Development of bacteria causing wilt in the alfalfa plant as influenced by growth and winter injury. *Journ. Agr. Res.* **37**: 545-569, fig. 1-10.

(5) KOEHLER, B. and JONES, R. F.
1932 Alfalfa wilt as influenced by soil temperature and soil moisture. *Ill. Agr. Exp. Sta. Bul.* **378**: 39-79, fig. 1-18.

(6) KREUTZER, W. A. and MCLEAN, J. G.
1943 Localisation and movement of the causal agent of ring rot in the potato plant. *Colorado Agr. Exp. Sta. Tech. Bul.* **30**: 1-28, fig. 1-5.

(7) LARSON, R. H., WALKER, J. C. and FOGELBERG, S. O.
1941 Bacterial ring rot in relation to the tomato. (Abstract) *Phytopath.* **31**: 14-15.

(8) LARSON, R. H.,
1944 The ring rot bacterium in relation to tomato and eggplant. *Journ. Agr. Res.* **69**: 309-325, fig. 1-6, pl. 1-3.

(9) SAVILLE, D. B. O. and RACICOT, H. N.
1937 Bacterial wilt and rot of potatoes. *Sci. Agr.* **17**: 518-522, fig. 1.

(10) SPIECKERMANN, A und KOTTHOFF, P.
1941 Untersuchungen über die Kartoffelpflanze und ihre Krankheiten. I. Die Bakterienringfäule der Kartoffelplanze. *Landw. Jahrb.* **46**: 656-732, ill. (cité par STAPP).

(11) STAPP, C.
1930 Beiträge zur Kentniss des *Bacterium sepedonicum* Spieckerm, et Kotth., des Erregers der Bakterienfäule der Kartoffel. *Ztschr. f. Parasitenk.* **2**: 756-823, illus.

(12) SKAPTASON, J. B.
1943 Studies on the bacterial ring rot disease of potatoes. *Corn. Univ. Exp. Sta. Mem.* 250.

REVISÃO DO HERBÁRIO DE MOÇAMBIQUE DO INSTITUTO BOTÂNICO DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA *

por

J. G. GARCIA

II

CARYOPHYLLACEÆ A MALVACEÆ

CARYOPHYLLACEÆ

Polycarpæa Lam.

Polycarpæa corymbosa (L.) Lam., Tabl. Encycl. Méth. Bot. II (1797) 129; *Achyranthes corymbosa* L., Sp. Pl. (1753) 205.

NIASSA: — Nampula, *Torre* 870, 1186.

SUL DO SAVE: — Inhambane - Velho, *Gomes e Sousa* 2144. — Cumbana (Granja do Estado), *Gomes e Sousa* 2153. — Lourenço Marques: Ressano Garcia (leito do rio Incomati), *Quintas* 1.

Fl. e fr. II-VII.

Polycarpæa corymbosa (L.) Lam. var. **effusa** Oliv., Fl. Trop. Afr. I (1868) 145.

NIASSA: — Pr. rio Messinge e na povoação indígena de Boronango, Mecaloja, *Torre* 545.

Fl. e Fr. IX.

Polycarpæa corymbosa (L.) Lam. var. **parviflora** Oliv., Fl. Trop. Afr. I (1868) 145.

NIASSA: — Moçambique: junto à baía, *Carvalho* s. n.

Fl. e fr. ?

---

* Trabalho subsidiado pela Junta das Missões Geográficas e de Investigações Coloniais. — *Vide* Bol. Soc. Broteriana, vol. XIX (2.ª sér.), 1945, págs 507-518.

Polycarpæa eriantha Hochst. ex A. Rich., Tent. Fl. Abyss. I (1847) 303.

NIASSA: — De Nampula a Ribaué e Lalaua, *Torre* 1450.
ZAMBÉZIA: — Vila Bocage, *leg.* ? 149.
Fl. e fr. V, VIII.

Silene L.

Silene Burchellii Otth ex DC., Prodr. Syst. Nat. Regni Veg. I (1824) 374.

NIASSA: — Vila Cabral, *Torre* 21, 160.
Fl. III; fl. e fr. VII.

ELATINACEÆ

Bergia L.

Bergia decumbens Planch. ex Harv., Thes. Cap. I (1859-1862) 15, t. 24.

SUL DO SAVE: — Lourenço Marques: Catembe, *Schlechter* 11607.
Fl. e fr. XII.

HYPERICACEÆ

Hypericum L.

Hypericum Lalandii Choisy in DC., Syst. Nat. Regni Veg. I (1824) 550.

NIASSA: — Arredores de Vila Cabral, *Torre* 558.
Fl. e fr. X.

Hypericum lanceolatum Lam., Encycl. Méth. Bot. IV (1797) 145.

ZAMBÉZIA ?: — Goninganha ?, *Carvalho* s. n.
Fl. e fr. ?

Harungana Lam.

Harungana madagascariensis Lam., Encycl. Méth. Bot. VI (1804) 314.

NIASSA: — Serra de Ribaué, junto a um regato, *Torre* 824.

ZAMBÉZIA: — Margem do Zambeze, *Carvalho* s. n.

Fl. II.

GUTTIFERÆ

Garcinia L.

Garcinia Livingstonei T. Anders. in Journ. Linn. Soc. IX (1867) 263. — Determinação de Kew, segundo lista de Gomes e Sousa

SUL DO SAVE: — Pr. Inhambane, *Gomes e Sousa* 1676.

Fr. XI.

BOMBACACEÆ

Adansonia L.

Adansonia digitata L., Sp. Pl. (1753) 1190.

NIASSA: — Nampula, *Torre* 922.

Fl. X-XI.

Bombax L.

Bombax rhodognaphalon K. Schum. ex Engl. in Abhandl. Preuss. Akad. Wiss. (1894) 34.

ZAMBÉZIA: — Malema, pr. margem do rio Malema, *Gomes e Sousa* 368.

Fl. VIII.

MALVACEÆ

Sida L.

Sida carpinifolia L. f., Suppl. (1781) 307.

NIASSA: — Nampula, *Torre* 1247.

SUL DO SAVE: — Inhambane, Rio das Pedras, *Gomes* e *Sousa* 1777.
Fl. III; fr. VII.

Sida longipes E. Mey. in Drège, Zwei Pfl. Docum. (1843) 222.
SUL DO SAVE: — Lourenço Marques: Incomati, margem direita do rio, *Quintas* 162. — Boane, *leg. ?* 80.
Fl. e fr. VI, X.

Sida alba L., Sp. Pl. ed. 2 (1763) 960.
MANICA E SOFALA: Tete-Mandi, *Pomba Guerra* s. n.
Fl. e fr. XI.

Sida spinosa L., Sp. Pl. (1753) 683.
SUL DO SAVE: — Lourenço Marques: Incomati, margem esquerda do rio, *Quintas* 143.
Fl. e fr. IV.

Sida cordifolia L., Sp. Pl. (1753) 684.
SUL DO SAVE: — Inhambane: Massinga, *Gomes* e *Sousa* 1749, err. 1750.
Fl. e fr. IV.

Sida grewioides Guill. et Perr. in Guill., Perr. et A. Rich., Fl. Senegamb. Tent. I (1830-1833) 71.
MANICA E SOFALA: — Tete, *Pomba Guerra* 21, 21?.
Fl. e fr. VI, XI.

Sida sp.
NIASSA: Nampula, *Torre* 819, 1310.
Fl. e fr. III-IV.

Wissadula Medic.

Wissadula amplissima (L.) R. E. Fries in Kungl. Svenska Vet. Akad. Handl. XLIII 4 (1908) 48, t. 4, f. 1-2; *Sida amplissima* L., Sp. Pl. (1753) 685.

Wissadula amplissima (L.) R. E. Fries var. **rostrata** (Schum. et Thonn.) R. E. Fries, l. c. 51, t. 6, f. 13; *Sida rostrata* Schum. et Thonn., Beskr. Guin. Pl. (1827) 306.

NIASSA: — Nampula, *Torre* 1372.

Fl. e fr. IV.

Abutilon Adans.

Abutilon Sonneratianum (Cav.) Sweet, Hort. Brit. (1827) 54; *Sida Sonneratia* Cav., Diss. I (1785) 29, t. 6, f. 4.

?: — Matola, *Schlechter* 11688.

Fl. XII.

Abutilon bidentatum Hochst. ex A Rich., Tent. Fl. Abyss. I (1847) 68.

SUL DO SAVE: — Lourenço Marques: Bombay, margem direita do rio Umbeluzi, *Quintas* 149.

Fl. e fr. VI.

Abutilon hirtum (Lam.) Don, Gen. Syst. I (1831) 503; non Sweet, Hort. Brit. (1827) 53; *Sida hirta* Lam., Encycl. Méth. Bot. I (1783) 7.

MANICA E SOFALA: — Tete, *Pomba Guerra* 25, 25a.

Fl. e fr. III-VIII.

Abutilon intermedium Hochst. ex Schweinf., Beitr. Fl. Æthiop. I (1867) 49.

MANICA E SOFALA: — Gorungosa, *Carvalho* s. n.

Fl. e fr. ?

Abutilon mauritianum (Jacq.) Medic., Künstl. Geschlecht. Malven-Fam. (1781) 28; *Sida mauritiana* Jacq., Misc. Austr. II (1781) 352.

NIASSA: — Mandimba e Linlezi, pr. rio Rovuma, Mecaloja, *Torre* 596. — Massangulo, *Torre* 1463. — Nampula, *Torre* 1340.

SUL DO SAVE: — Região litoral pr. rio Maputo, *Gomes e Sousa* 19, 19a, 19b.

Fl. e fr. IV-IX.

Abutilon indicum (L.) Sweet, Hort. Brit. (1827) 54; Don, Gen. Syst. I (1831) 504; *Sida indica* L., Cent. Pl. II (1756) 26; Amœn. Acad. IV (1759) 324.

MANICA E SOFALA: — Gorungosa, *Carvalho* s. n.

Fl. e fr. ?

Urena L.

Urena lobata L., Sp. Pl. (1753) 692.

NIASSA: — Mandimba, margens do rio Lugenda, *Torre* 436. — Cabeceira Pequena, *Carvalho* s. n. — Nampula, *Torre* 688, 1441.

SUL DO SAVE: — Rio Ave, 20 km. ao sul de Inhambane, *Gomes e Sousa* 1755.

Fl. e fr. IV-VIII.

Pavonia Cav.

Pavonia Kotschyi Hochst. in Flora XXIV (1841); et in Webb, Fragm. Fl. Æthiop. 43.

NIASSA: — De Memba a Nacala, *Torre* 1429.

Fl. e fr. V.

Pavonia fruticulosa Ulbr. in Engl., Bot. Jahrb. LVII (1920) 153.

SUL DO SAVE: — (Região litoral) Manhiça, *Gomes e Sousa* 20. Determinação do Brit. Museum, 1937. — Ilha do Bazaruto, *Gomes e Sousa* 1783, 1836. Determinação de Kew, segundo lista de Gomes e Sousa.

Fl. e fr. VII-VIII.

Pavonia odorata Willd., Sp. Pl. III 1 (1801) 837.

NIASSA: — Moçambique: Cabeceira Pequena, *Carvalho* s. n.

SUL DO SAVE: — Lourenço Marques, *Schlechter* 11708.

Fl. e fr. XII.

Pavonia Columella Cav., Diss. III (1787) 138, t. 48, f. 3.

NIASSA: — Monte de Massangulo, *Gomes e Sousa* 1499.

MANICA E SOFALA: — Gorungosa, *Carvalho* s. n.
Fl. e fr. VI.

Hibiscus L.

Hibiscus micranthus L. f., Suppl. (1781) 308, 310.
NIASSA: — Nampula, *Torre* 609, 1427.
Fl. e fr. V-VIII.

Hibiscus Deberstii Wildem. et Th. Dur. in Compt. Rend. Soc. Bot. Belg. XXXVIII 18. — Determinação do Brit. Museum.
NIASSA: — Mecaloja pr. Posto de Sanga, *Torre* 433.
Fl. e fr. I.

Hibiscus rhodanthus Gürke apud Schinz in Bull. Herb. Boiss. III (1895) 405.
NIASSA: — Missão Católica de Unango, *Gomes e Sousa* 1036. — Planalto da Lichinga, *Gomes e Sousa* 1066. — Vila Cabral, *Torre* 563.
Fl. e fr. VIII-XII.

Hibiscus surattensis L., Sp. Pl. (1753) 696.
NIASSA: — Nampula, *Torre* 1381.
ZAMBÉZIA: — De Alto Molocué a Gurué, *Torre* 1477.
SUL DO SAVE: — Pr. Inhambane, *Gomes e Sousa* 1810. — Lourenço Marques, *Quintas* s. n.
Fl. e fr. IV-V, VIII.

Hibiscus cannabinus L., Syst. Nat. ed. 10 (1759) 1149.
NIASSA: — Arredores de Mecaloja (antigo Posto), *Torre* 434. — Arredores de Vila Cabral, *Torre* 78, 79. — Massangulo, *Gomes e Sousa* 1401.
ZAMBÉZIA: — Margens do Zambeze, *Carvalho* s. n.
Fl. e fr. IV-V, IX.

Hibiscus shirensis Sprague et Hutch. in Kew Bull. (1907) 47.
NIASSA: — Arredores de Vila Cabral (Lichinga), *Torre*

432. — Massangulo, *Gomes e Sousa* 1307, 1399, 1405. — Nampula, *Torre* 812, 1332.
Fl. e fr. I-IV.

Hibiscus cæsius Garcke in Bot. Zeit. VII (1849) 850.
SUL DO SAVE: — Tete, *Pomba Guerra* 76, 88.
Fl. I.

Cf. **Hibiscus Kirkii** Mast. in Oliv., Fl. Trop. Afr. I (1868) 199.
NIASSA: — Nampula, *Torre* 844.
Fl. e fr. III.

Hibiscus physaloides Guill. et Perr. in Guill., Perr. et A. Rich., Fl. Senegamb. Tent. I (1830) 52.
NIASSA: — Nampula, *Torre* 1254. — Entre Nampula, Nametil, Meconta e Ribaué, *Torre* 1385.
MANICA E SOFALA: — Beira, *Dr. Braga* s. n.
SUL DO SAVE: — Lourenço Marques, *Schlechter* 11711.
Fl. XII, II; fl. e fr. IV.

Hibiscus cordatus Harv. in Harv. et Sond., Fl. Cap. I (1859-1860) 172.
SUL DO SAVE: — Lourenço Marques, *Pomba Guerra* 123. — Marracuene, *Quintas* 31.
Fl. e fr. II-IV.

Hibiscus Torrei Bak. f. in Journ. Bot. LXXV (1937) 101.
NIASSA: — Arredores de Vila Cabral, *Torre* 435.
Fl. e fr. VII.

Hibiscus diversifolius Jacq., Coll. Bot. Chem. Hist. Nat. II (1788) 307; Ic. Pl. Rar. III (1786-1793) 12, t. 551.
NIASSA: — Pr. regato Milungo, a uns 20 km. de Maniamba, *Torre* 431. — Pântano junto do Lago Niassa pr. M'Bueca, *Gomes e Sousa* 1521.
SUL DO SAVE: — Inhambane: Mutamba, *Gomes e Sousa* 1756.
Fl. e fr. VII-VIII.

Hibiscus calyphyllus Cav., Diss. V (1788) 283, t. 140.
Forma. — Determinação do Brit. Museum.

SUL DO SAVE: — Maputo, *Gomes e Sousa* 171.
Fl. e fr. IX.

Hibiscus lobatus (Murr.) Kuntze, Rev. Gen. Pl. III 2 (1898) 19; *Solandra lobata* Murr. in Comm. Soc. Reg. Sc. Götting. VI (1785) 20, t. 1.
NIASSA: — Moçambique: Cabeceira Pequena, *Carvalho* s. n.
Fl. e fr. ?

Hibiscus tiliaceus L., Sp. Pl. (1753) 694.
NIASSA: — Moçambique, baía de Mossuril, *Carvalho* s. n. — Moçambique, margens dos rios, *Carvalho* s. n. — Mossuril, *Torre* 1550.
SUL DO SAVE: — Inhambane pr. barra, *Gomes e Sousa* 1875. — Inhambane pr. litoral, *Torre* 1588.
Fl. e fr. V, IX-X.

Hibiscus sp.
NIASSA: — Moçambique: Cabeceira Pequena, *Carvalho* s. n., sub nom. *Hibiscus micranthus* Cav.
Fl. ?
MANICA E SOFALA: — Beira, *Dr. Braga* sub nom. *Hibiscus furcatus* Roxb.
Fr. ?
SUL DO SAVE: — Boane, *leg.?* 79.
Fl. IX.

Thespezia Soland. ex Corr.

Cf. **Thespezia Lampas** (Cav.) Dalz. ex Dalz et Gibs., Bomb. Fl. (1861) 19; *Hibiscus Lampas* Cav., Diss. III (1787) 154.
NIASSA: — Nampula, *Torre* 1259.
Fl. e fr. II.

Gossypium L.

Gossypium microcarpum Tod., Rel. sui cot. colt. nell'anno 1864, p. 151, et ind. sem. Hort. bot. pan. ann. 1864.

p. 32. — Determinação de Kew, segundo lista de Gomes e Sousa.

SUL DO SAVE: — Massinga, *Gomes* e *Sousa* 1938.

Fr. XII.

Gossypium sp.

SUL DO SAVE: — Junto da estrada de Morrumbene a Massinga, pr. km. 20 de Massinga, *Gomes e Sousa* 2190.

Fr. I.

ESTUDOS SOBRE A FLORA DE PORTUGAL

por

J. G. GARCIA *

Instituto Botânico da Universidade de Coimbra

I

INTRODUÇÃO

COM o presente trabalho, iniciamos a publicação de uma série de notas sobre a flora portuguesa, elaboradas com o objectivo de contribuirmos, na medida das nossas possibilidades, para um mais completo conhecimento florístico de Portugal.

Estas notas correspondem a estudos realizados sobre plantas vivas ou de herbário, e só excepcionalmente dirão respeito a material não visto.

A ordem seguida na exposição dos assuntos é a da 2.ª edição da Flora de Portugal de PEREIRA COUTINHO (1939), a que fazemos muitas vezes referência, por ser actualmente a melhor e mais completa obra de conjunto relativa à florística do nosso país.

Citamos também frequentemente o Manual da Flora Portuguesa de GONÇALO SAMPAIO (1909-1914), trabalho incompleto mas por diversos títulos notável (1).

Os espécimes que registamos encontram-se nos herbários que vão indicados pelas abreviaturas propostas por J. LANJOUW, Chronica Botanica V (1939) 142-150.

---

* Bolseiro do Instituto para a Alta Cultura.

(1) Nas referências a esta obra, mencionamos as datas da publicação dos fascículos, que, segundo uma nota manuscrita pelo autor, são as seguintes:

p. 1-48	1909	p. 321-368	1912
49-208	1910	369-384	1913
209-320	1911	385-416	1914

Nesta notícia assinalamos:

a) Cinco plantas novas para a flora de Portugal: 1 — *Asplenium septentrionale* (L.) Hoffm., espécie pertencente à secção *Acropteris*, também nova para a nossa flora; 2 — *Poa nemoralis* L., *sensu stricto*; 3 — *Echium plantagineum* L. forma *megalanthum* (LaPeyr.) nob.; 4 — *Echium plantagineum* L. forma *cyaneiflorum* nob., f. n.; 5 — *Phalacrocarpum oppositifolium* (Brot.) Willk. forma *macrocephalum* Willk. — As duas primeiras foram herborizadas pelo Sr. P.e António de Barros Carneiro (1), nas proximidades de Bragança; as duas seguintes, por nós, nos arredores da Guarda; e a última, também por nós, na Serra da Estrela.

b) Três, não mencionadas por Pereira Coutinho (1939), mas consideradas da nossa flora por outros autores: 1 — *Amaranthus hypochondriacus* L.; 2 — *Amaranthus patulus* Bert. var. *incurvatus* (Gren. et Godr.) Arcang.; 3 — *Vicia villosa* Roth. — As duas primeiras foram colhidas pelo Sr. Dr. J. Pinto Lopes (2), perto de Caldas da Rainha, e a terceira, por nós, em Manteigas.

c) Regiões ou localidades novas para plantas da nossa flora.

d) Regiões ou localidades não indicadas por Pereira Coutinho (1939).

e) Aditamentos ou correcções a trabalhos por nós publicados, e outras notas referentes a plantas da flora portuguesa.

---

(1) A este distinto colector, membro devotado da Sociedade Broteriana, devemos o material de herbário correspondente a diversas plantas novas para a nossa flora, e muitos exemplares de outras encontradas pela primeira vez nas regiões do Minho e Trás-os-Montes. Por tudo, aqui lhe deixamos consignado o testemunho do nosso profundo reconhecimento.

(2) Agradecemos ao Sr. Dr. J. PINTO LOPES, 1.º Assistente de Botânica na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, a remessa deste material, e as informações que se dignou prestar-nos.

Relativamente às plantas novas para a flora do nosso país, seguimos o critério de indicar a sinonímia, tão completa quanto possível, e a *exsiccata* consultada. Para o reconhecimento de cada uma destas plantas, elaboramos uma descrição onde são indicados os caracteres taxonómicos fundamentais, fazendo-a preceder, sempre que as circunstâncias o permitem, da diagnose original. Quando se trata de plantas novas para a Ciência, acrescentamos a diagnose latina, preconizada pelas Regras Internacionais da Nomenclatura Botânica (1935).

Sobre as plantas portuguesas já conhecidas, damos apenas as indicações que reputamos necessárias para o esclarecimento dos assuntos que lhes dizem respeito.

Sempre que possível, e de harmonia com todos os elementos de informação de que dispomos, indicamos para cada planta as províncias onde foram colhidos exemplares (1).

* * *

Queremos deixar aqui expressos os protestos da nossa profunda gratidão ao Exmo Sr. Prof. Dr. Abílio Fernandes, Director do Instituto Botânico da Universidade de Coimbra, por todas as facilidades que nos tem concedido para podermos realizar os nossos trabalhos.

Agradecemos também reconhecidamente aos Ex.^mos^ Srs. Prof. Dr. Américo Pires de Lima, Director do Instituto de Botânica da Universidade do Pôrto, Prof. Dr. Flávio Resende, Director do Instituto Botânico da Universidade de Lisboa, e Prof. António de Sousa da Câmara, Director da Estação Agronómica Nacional, a amabilidade com que nos permitiram e facilitaram a consulta das valiosas colecções existentes nos herbários dos estabelecimentos científicos que superiormente dirigem.

Queremos igualmente manifestar o nosso reconhecimento a todos os que nos prestaram a sua valiosa colaboração, entre os quais destacamos particularmente os Ex.^mos^ Srs. Eng.º António Rodrigo Pinto da Silva, Investigador

---

(1) Relativamente à província de Trás-os-Montes e Alto Douro, porém, mencionamos separadamente as regiões trasmontana e duriense. Quando citamos o Alentejo, referimo-nos às províncias do Alto e Baixo Alentejo.

da Estação Agronómica Nacional, Dr. CARLOS DAS NEVES TAVARES, Naturalista do Instituto Botânico da Universidade de Lisboa, e Dr. ARNALDO ROZEIRA, 1.° Assistente da Faculdade de Ciências da Universidade do Pôrto, que muito nos auxiliaram na tarefa da consulta dos herbários onde trabalham.

Muito grato ficamos ainda ao Instituto para a Alta Cultura, pela bolsa de estudo que nos concedeu para a realização deste trabalho.

POLYPODIACEÆ

ASPLENIUM L.

Asplenium septentrionale (L.) Hoffm.

Durante as explorações botânicas que realizámos em Maio de 1944, tivemos o prazer de visitar em Bragança o Rev. P.e ANTÓNIO DE BARROS CARNEIRO, membro dedicado da Sociedade Broteriana, a quem a florística portuguesa já deve assinalados serviços.

Não nos sendo possível relatar aqui pormenorizadamente essa visita, tão agradável como proveitosa, vimos apenas mencionar o facto de nela nos ter sido apresentada uma interessante pteridófita que o Sr. P.e CARNEIRO colhera, havia dois dias, nos arredores daquela cidade.

Como a falta de elementos bibliográficos nos não permitisse classificar a planta *in loco*, pedimos ao distinto herborizador que no-la remetesse para o Instituto Botânico da Universidade de Coimbra, onde, em face dos exemplares, verificámos tratar-se de *Asplenium septentrionale* (L.) Hoffm., espécie nova para a flora do nosso país (Est. I) (1).

Asplenium septentrionale (L.) Hoffm., Deutschl. Fl. II (1795) 12; Sw. in Schrad., Journ. Bot. 1800 II 1 (1801) 50 et 1801 I 2 (1803) 283; Lam. et DC., Fl. Fr. ed. 3 II (1805) 553; Willd., Sp. Pl. V 1 (1810) 307; LaPeyr., Hist.

(1) No herbário de A. R. DA CUNHA figura um exemplar (LISE. 10063) desta espécie, sem indicação de localidade. Deve tratar-se, certamente, de material exótico, o que aliás sucede com outros exemplares que figuram no mesmo herbário.

Abr. Pl. Pyr. II (1818) 627; Spreng., Syst. Veg. ed. 16 IV 1 (1827) 81; Duby, Bot. Gall. ed. 2 I (1828) 540; Lois., Fl. Gall. ed. 2 II (1828) 361; Colm., Ap. Fl. Cast. (1849) 164; Thurm., Ess. Phytost. I (1849) 135, 291, et II (1849) 275; Ledeb., Fl. Ross. IV (1853) 521; Gren. et Godr., Fl. Fr. III (1856) 637; Koch, Syn. Fl. Germ. et Helv. ed. 3 II (1857) 737; Hook., Sp. Fil. III (1860) 174; Willk. et Lange, Prodr. Fl. Hisp. I (1861) 7; Bedd., Ferns Brit. India IV (1865) t. 60 et Handb. Ferns Brit. India (1883) 145; Vallot in Bull. Soc. Bot. Fr. XXX (1883) p. XVIII-XXI; Benth., Handb. Brit. Fl. II (1865) 1053; Milde, Fil. Eur. et Atl., As. Min. et Sib. (1867) 81-82; Hook. et Bak., Syn. Fil. ed. 2 (1874) 198; Nym., Consp. Fl. Eur., Suppl. I (1883-1884) 864; Boiss., Fl. Or. V (1884) 734; Yates'Cat. Ferns North Amer. (1886) 3; Syme, Engl. Bot. XII (1886) 138, t. 1882; Buyss., Fil. (1890) 44; Correv., Foug. Rust. (1890) 97-101, f. 22; Wittrock in Acta Horti Berg. I 8 (1891) t. 2, f. 7; Gandoger (1), Fl. Eur. XXVII (1891) 104, et Nov. Consp. Fl. Eur. (1910) 518; Fiori et Paol., Ic. Fl. Ital. I (1895-1899) t. 5, f. 33 et Fl. Anal. Ital. I (1896-1898) 12; Asch. et Graebn., Syn. Mitteleur. Fl. I (1896-1898) 63 (sub. nom. gen. *Asplenum);* Christ, Farnkr. Erde (1897) 201, et Foug. Alpes Marit. (1900) 8; Grec., Consp. Fl. Romaniei (1898) 652; Wild. et Dur., Prodr. Fl. Belge II (1898) 513; Ibiza, Comp. Fl. Esp. I (1906) 565; Coste, Fl. Descr., Ill. Fr. III (1906) 695; Christ., Index Fil. (1906) 131; Rouy, Fl. Fr. XIV (1913) 442; Rydb., Fl. Prair. a. Plains Centr. North Amer. (1932) 12; Mansfeld, Verzeich. Farn- u. Blütenpfl. Deutschen Reiches (1940) 14; Ic. nostra t. I.— *Acrostichum septentrionale* L., Sp. Pl. (1753) 1068; Fl. Dan. I (1761) t.

---

(1) Segundo M. GANDOGER (1891), *Asplenium septentrionale* (L.) Hoffm. compreende *A. memorabile, moravicum, Langei, hercynicum, centrale, bellojocense, Notarisii, litigans, humilius, fallaciosum, cebennense, maternum, ortholobum, notatum, fictum, volitum, editicolum, Mathonneti, pisanum, belgicum, inconcessum, chersonense, subalpinum, vicinum, limitaneum, omissum, brigantiacum, exerrans, vergens, zelotes, suecicum, volhynicum, socors, Kovatsii, alandicum, onustum* e *aragonense* Gand., e ainda *A. bifurcatum* Opiz, que nos parecem simples formas ecológicas ou geográficas daquela espécie. Mais tarde (**1910**), porém, aquele autor considera apenas *A. aragonense* Gand. e *A. bifurcatum* Opiz dentro da espécie *A. septentrionale* (L.) Hoffm.

60; Lam., Ill. V (1797-1819) t. 865, f. 3. — *A. laciniatum* Gilib., Exerc. Phyt. II (1792) 555. — *Pteris septentrionalis* Sm. (cit. Spreng., l. c.). — *Scolopendrium septentrionale* Roth, Röm. Mag. II 1 (1799) 105, et Tent. Fl. Germ. III (1800) 49. — *Belvisea septentrionalis* Mirb., Hist. Nat. Veg. V (1802?) 473. — *Asplenium bifurcatum* Opiz, Kratos IV (1819) (cit. Christ., l. c.). — *A. bifurcum* Opiz, Böh. Phan. u. Crypt. Gew. (1823) (cit. Christ., l. c.). — *Blechnum septentrionale* Wallr., Fl. Crypt. Germ. I (1831) 24. — *Acropteris septentrionalis* Link, Hort. Berol. II (1833) 56. — *Amesium septentrionale* Newm., Hist. Brit. Ferns ed. 2 (1844) 10. — *Asplenium septentrionale* var. *depauperatum* Christ., Farnkr. Schw. (1900) 104, f. 21.

«ACROSTICHUM (*septentrionale*) fronde nuda, lineari laciniata» L., l. c.

Esporófito: — Planta vivaz de 5-20 cm. Rizoma curto, densamente radicante, cespitoso, vestido de escamas sublineares acastanhadas. Folhas numerosas, coriáceas, dispostas em tufos; pecíolo delgado, mais longo que o limbo, flexuoso, canaliculado, vermelho-acastanhado na base, glabro ou provido de pêlos patentes unicelulares; limbo atenuado insensìvelmente para a parte inferior (1), glabro, raras vezes simples, em regra 1-2 vezes dividido por falsa dicotomia em segmentos lineares ou linear-lanceolados, mais ou menos peciolulados, inteiros ou 2-3-inciso-dentados na parte terminal; nervação paralela. Soros lineares, por fim confluentes e cobrindo quase toda a superfície inferior dos segmentos; indúsio inteiro, linear, muito alongado, inserido lateralmente junto à margem dos folíolos. Esporângios globosos, com o anel curtamente interrompido e o pedículo subigual ao diâmetro daqueles. Esporos elipsoidais, finamente granuloso-tuberculados. (V. v.).

Gametófito, n. v.

Esporogénese: Maio-Setembro (2).

(1) Devido a este carácter, não é possível dizer com precisão onde termina o pecíolo e começa o limbo.

(2) Têm sido, por vezes, encontrados alguns exemplares em esporogénese fora da época normal. (Cf. *Exsiccata*).

Habitat: Fendas das rochas. — Alto Trás-os-Montes: arredores de Bragança.

Espécimes: Nas fendas de uma fraga, ponte da estrada de Rabal, arredores de Bragança, 11-5-1944, *P.e A. Carneiro* 441, COI.

Distribuição: Trás-os-Montes.

Exsiccata: ESPANHA: pr. Albarracin in Aragonia australi, 1-1879, *Zapater* s. n. in Herb. Willk. — FRANÇA: Fentes de rochers du schiste de transition au pied des montagnes près de Weissenburg en Alsace, 12-7-1856, *F. Schultz* 12 in F. Schultz et F. Winter herb. norm., Crypt., Cent. I; Uriage (Isère), l'arcière, contre les rochers, 8-8-1873, *Tillet* s. n. in Fl. Fr.; Loire, Lavalla, vieux murs, terrain schisteux, 8-1874, *J. Hervier* s. n.; La Ferrière (Isère) sous les 7-Laux, rochers, 11-9-1876, *Tillet* s. n. in Fl. Fr.; Alier-Besson, 8-7-1894, *S. E. Lassimonne* 701, sér. 2, in Gall. med. fl. exs. — SUÍÇA: Rochers calcaires sur la colline des Follaterres près de Martigny vers 650 m., 27-4-1909, *L. Marret* 329 in Exs. Fl. Valais et Alpes Léman. — BÉLGICA: Entre La Reid (station) et Marteau, 8-1905, *É. de Wildeman* s. n. ex Herb. Hort. Bruxell. — ALEMANHA: Göttingen, 1857, *leg. ?* s. n.; Harz, Bodethal, 31-5-1884, *Hoffmann* s. n. in Fl. hercynica; Reichenstein, 19-8-1894, *Ziesché* 1193 in A. Callier, Fl. Siles. exs.; Dresden, an Felsen im Thale bei Maxen, 11-8-1903, *G. A. Poscharsky* s. n. in Fl. Saxonica. — ÁUSTRIA: Austria inferior, in monte «Ianerling» pr. «Krems», 6-1892, *Krauer* s. n.; Austria inferior, in declivibus petrosis pr. «Krems», solo schistoso, 250-300 m. s. m., 8-1894, *J. Baumgartner* 3677 in Dörfl. Herb. Norm. — ESCÓCIA: Arthur's Seat (Edinburgh), 6-1850, *John T. Syme* 1401 in Bot. Soc. Lond.; ibid., 6-1852, *leg. ?*. — SUÉCIA: Sm., Moheda, 8-1876, *Hyltén-Cav.* s. n. in Fl. Scand.; in saxis graniticis pr. Tisnarem lacum Sudermanniæ occidentalis, 29-7-1884, *Ernstslemmendorff* s. n. in Pl. Suec.

A posição sistemática desta pteridófita tem sido largamente discutida, pois, como se vê pela sinonímia mencio-

nada, a planta foi incluída por diversos taxonomistas nos géneros *Acrostichum*, *Pteris*, *Asplenium*, *Scolopendrium*, *Belvisea*, *Blechnum*, *Acropteris* e *Amesium*, o que mostra as dificuldades que surgiram na observação e interpretação dos seus caracteres genéricos. Modernamente, todos os autores a consideram como pertencente ao género *Asplenium* L., sendo interessante registar aqui a opinião de O. SWARTZ in Schrad. Journ. Bot. 1801 I 2 (1803) 283, uma das mais antigas sobre o assunto, expressa nos termos seguintes: — «Nec Acrostichum nec Pteris esse potest. Fructificationes aetate quidem confluunt, indusium vero adest, quo Acrostichum caret. Fructificatione submarginali generi Pteridis propius accedit. Non tamen ipso margini frondis, sed intra illum a margine parum remotae insident, lineolae fructiferae ipso nervo submarginali, quo indusium, intus versus dehiscens, ortum suum ducit. Saepe lineae 2-3 interruptae alternaeque sunt unde Aspleniis simillimae, quamvis non obliquae fiant».

Segundo as classificações de DIELS e CHRISTENSEN (1), *A. septentrionale* (L.) Hoffm. pertence à secção *Acropteris* (2), também nova para a nossa flora. Até agora, eram conhecidas em Portugal apenas as secções *Hemionitidastrum* e *Euasplenium*.

As três secções actualmente representadas na flora portuguesa distinguem-se fàcilmente pelos caracteres seguintes:

A. — Secção **Hemionitidastrum**: Folhas simples, palminérveas, cordiformes na base, e normalmente com 3-5 lobos agudos ou os dois inferiores obtusos. — *Asplenium Hemionitis* L.

B. — Secção **Acropteris**: Folhas normalmente divididas por falsa dicotomia em segmentos sublineares pouco

(1) *Vide* DIELS in Engl. et Prantl, Pflanzenfam. I 4 (1902) 295, et CHRIST., Index Fil. (1906) p. XXXIII-XXXIV.

(2) Esta secção corresponde ao género *Acropteris* estabelecido por LINK para a planta em estudo, a propósito da qual HOOKER, Sp. Fil. III (1860) 175, diz: — « There is a peculiarity in the general form of the pinnae of this plant, and especially in the very elongated sori and involucres, but scarcely character enough to constitute a new genus *(Acropteris)* as Link has done ».

numerosos (em regra 2-4), inteiros ou 2-3-inciso-dentados na parte terminal. — *Asplenium septentrionale* (L.) Hoffm.

C. — Secção **Euasplenium**: Folhas nìtidamente 1-4-pinatisectas. — *Asplenium marinum* L., *A. Trichomanes* L., *A. glandulosum* Lois., *A. lanceolatum* Huds., *A. Ruta-muraria* L. e *A. Adiantum-nigrum* L.

Ecologia e distribuição geográfica: *Asplenium septentrionale* (L.) Hoffm. vegeta quase exclusivamente nos terrenos pedregosos em que predominam as rochas ácidas. É uma planta notàvelmente calcífuga, pois, embora tenha sido, por vezes, encontrada em regiões onde o calcáreo é dominante, tem-se verificado que ela sòmente se desenvolve sobre rochas silicatadas (1).

Encontra-se ordinàriamente nas fendas de rochedos graníticos, xistosos ou quartzíticos, ou ainda sobre certas rochas vulcânicas.

A sua área geográfica estende-se pela Europa, Ásia média e boreal, África setentrional (Argélia), e América

---

(1) *Vide:* THURM., l. c.; VALLOT, l. c.; MILDE, l. c.; CORREV., l. c.; ROUY, l. c.; KARL WETZEL in VERDOORN, Manual of Pteridology (1938) 363.

Segundo refere VALLOT, CONTEJEAN afirma que a planta em questão é uma das melhores características da presença da sílica. Aquele autor, tendo encontrado uma estação da planta sobre o quartzito compacto de Lodève, em um dique que se levanta através do calcáreo devónico, procedeu à análise química de mais de trinta amostras de terrenos dessa formação geológica, e teve ocasião de verificar que « partout où la roche est carbonatée, l'*Asplenium septentrionale* ne se montre pas... La plante pousse dans des fentes ne contenant qu'une terre extrêmement rare, qui ne renferme que des traces de carbonates terreux ». VALLOT contesta a doutrina de THURMANN, segundo a qual a planta se desenvolve sob a influência de certas propriedades físicas do solo, dizendo : « Je ne puis trouver dans la théorie de l'influence physique prépondérante du sol aucune raison qui puisse expliquer ce fait curieux de dispersion, tandis qu'au point de vue de l'influence chimique, il suffit de remarquer que le sol est purement siliceux, pour y expliquer la présence d'une espèce calcifuge ».

É particularmente curiosa a hipótese de HENRY CORREVON, segundo a qual a planta teria sido transportada para as regiões calcáreas sobre blocos erráticos de natureza granítica : « Descendue (cette plante) des Alpes lors de l'époque glaciaire, elle s'est maintenue sur les blocs erratiques qui sont parsemés sur les flancs du Jura et jusque dans les plaines de la France, de l'Allemagne et de l'Autriche. Fait curieux à constater, elle est restée attachée à ces blocs de granit,

do Norte central e ocidental (Dakota do Sul, Wyoming, Novo México, Arizona e Baixa Califórnia).

Como planta saxátil, esta pteridófita tem condições de vida desde o nível do mar até grandes altitudes. Na Europa tem sido observada até mais de 2.800 m. s. m., e na Ásia eleva-se além de 3.600 m. (1).

Não obstante a sua extensa área geográfica e as condições de xerofilia em que pode desenvolver-se, esta espécie é relativamente rara, dado o afastamento e a pequena extensão das suas estações ecológicas.

O facto de a planta não ter sido anteriormente descoberta em Portugal, e de, nos arredores de Bragança, bem conhecidos pelo colector, só se conseguir encontrar para ela uma estação, leva-nos a crer que esta espécie é muito rara no nosso país.

Por êste motivo, e atendendo à situação geográfica dessa estação, parece-nos muito provável que a planta se tenha propagado de Espanha para Portugal através da província de Leão, onde foi herborizada por ORTEGA e outros colectores.

---

qui l'ont amenée, il y a des centaines de milliers d'années, parfois jusqu'à plus de cent lieues de ses stations d'origine. On trouve, en pleine région calcaire et jurassique, des blocs erratiques provenant des Alpes valaisannes et qui sont garnis d'*Asplenium septentrionale*, tandis que le terrain sur lequel ces rocs ont été trasportés est dépourvu de cette plante. Cela se peut voir sur plusieurs groupes de blocs erratiques du Jura et du Nord de l'Allemagne, où cette espèce se rencontre à l'état de plante très rare. De quelle admirable ténacité, de quelle puissance de vie nous paraît-elle animée pour avoir ainsi, au travers d'une immensité de siècles, persisté dans sa lutte pour l'existence et s'être maintenue malgré toutes les circonstances défavorables, dans des territoires où elle végète en étrangère et en pauvre exilée ! Peut-être aussi doit-on attribuer la dissémination de cette espèce, douée de spores si ténues et faciles à voyager, à l'influence des courants atmosphériques qui en auraient transporté les germes de vie à de très grandes distances. On ne peut cependant s'empêcher d'établir un parallèle entre elle et de nombreuses plantes alpines, qui sont descendues des hauts sommets lors de l'époque glaciaire, et se sont maintenues dans certains marécages ou dans certaines tourbières du plateau suisse et de la grande plaine allemande. Il est certainement plausible d'attribuer une origine glaciaire à la présence de cette espèce dans les territoires dont la nature lui est contraire ».

(1) *Vide:* BEDDOME, l. c.; H. GAMS in VERDOORN, Manual of Pteridology (1938) 388.

SPARGANIACEÆ

SPARGANIUM L.

Sparganium erectum L. subsp. **polyedrum** (Asch. et Graebn.) Schinz et Thell.

Esta subespécie encontra-se não sòmente em Coruche pr. Sorraia, como indica PEREIRA COUTINHO (1939), mas também em outros pontos do Ribatejo, e na região pantanosa de S. Fagundo pr. Coimbra. (V. s.).

Espécimes: S. Fagundo pr. Coimbra, 7-1894, *M. Ferreira* s. n., COI.; entre Chabouco e Casal Pequeno (Ribatejo), 9-1926, *A. Passos* 147, LISE. 1318.

Distribuição: Beira Litoral e Ribatejo.

GRAMINEÆ

HELEOCHLOA Host.

Heleochloa schoenoides (L.) Host.

Além das regiões Beira meridional, Estremadura e Alentejo, mencionadas por PEREIRA COUTINHO (1939) para esta espécie, temos a considerar as províncias litorais do Douro e da Beira, e ainda o Alto Douro. GONÇALO SAMPAIO (1910) indica para a planta a parte do país compreendida entre o Douro e a Estremadura (V. s.).

Espécimes: Porto, areais do Douro, 5-1896, *G. Sampaio* s. n., PO.; Gaia: Avintes, arredores do Douro, 6-1895, *G. Sampaio* s n., PO.; Gaia: Areinho de Quebrantões, 7-1897, *J. Tavares* s. n., PO.; Foz-Tua, 6-1905, *leg. ?* s. n., PO.; arredores de Montemor-o-Velho, 10-1910, *M. Ferreira*, in Fl. Lusit. Exs. 1815, COI.; Alfarelos, 24-8-1943, *F. Lemos* s. n., COI.

Distribuição: Douro Litoral, Alto Douro, Beira Litoral, Beira Baixa, Ribatejo, Estremadura e Alentejo.

AIRA L.

Aira Cupaniana Guss.

Esta espécie é nova para a flora de Trás-os-Montes, onde foi herborizada, em Abril de 1943, pelo Rev. Barros Carneiro. (V. v.).

Espécimes: Bragança: caminho da capela de S. Lázaro, 10-4-1943, P.e *A. Carneiro* 420, COI.

Distribuição: Trás-os-Montes e províncias ao sul do Douro.

TRISETUM Pers.

Trisetum scabriusculum (Lag.) Coss.

No nosso país, esta espécie é bastante rara, tendo sido encontrada apenas na região do Alto Douro. Recentemente, porém, foi herborizada no Alto Trás-os-Montes pelo Sr. P.e Barros Carneiro. As únicas localidades de onde a planta fica sendo conhecida são Barca de Alva e Gimonde. (V. v.).

Espécimes: Gimonde, pr. Bragança, 5-6-1943, P.e *A. Carneiro* 447, COI.

Distribuição: Trás-os-Montes e Alto Douro.

POA L.

Poa nemoralis L., *sensu stricto*

Em Junho de 1943, o Sr. P.e Barros Carneiro herborizou nos arredores de Bragança uma curiosa gramínea, que verificámos pertencer ao tipo de *Poa nemoralis* L.

Pereira Coutinho (1939), seguindo Júlio Henriques, Gramineas (1905) 122, menciona apenas, dentro da espécie, a variedade *rigidula* M. et K.; Gonçalo Sampaio (1910), porém, cita a espécie *(sensu amplo ?)*, mas, pelas indicações topográficas, parece referir-se ùnicamente aos exemplares

da variedade, por ele colhidos, em Junho de 1900, no esteiro de Avintes (Vila Nova de Gaia) (1).

Tendo em consideração a bibliografia e os exemplares de herbário revistos, consideramos a gramínea em questão como nova para a flora de Portugal (Est. II).

Poa nemoralis L., Sp. Pl. (1753) 69, *sensu stricto;* Fl. Dan. V (1778) t. 749; Sowerby et Sm., Engl. Bot. XVIII (1804) t. 1265; Lam. et DC., Fl. Fr. ed. 3 III (1805) 61; Spreng., Syst. Veg. I (1825) 337; Steud., Nom. Bot. II (1841) 361; Colm., Ap. Fl. Cast. (1849) 156; Nym., Consp. Fl. Eur. (1878-1882) 834; Richter, Pl. Eur. I (1890) 85; Acl., Fl. Fr. (1894) 702, t. 276, f. 3; Coste, Fl. Descr. Ill. Fr. III (1906) 613; Schinz et Kell., Fl. Suisse (1909) 65; Rydberg, Fl. Prair. et Plains Centr. N. Amer. (1932) 118; Ic. nostra t. II. — *Festuca airoides* Lam., Encycl. Méth. Bot. II (1786) 464. — *Poa nutans* Gilib., Exerc. Phyt. II (1792) 532, non al. — *P. debilis* Thuill., Fl. Env. Par. ed. 2 (1799) 43; non Torr., Fl. N. York II (1843) 459. — *P. juncea* Suter, Fl. Helv. I (1802) 46. — *P. gracilescens* Schrad., Hort. Gött. I (1809) ex Roem. et Schult., Syst. II (1817) 547. — *P. glauca* Bast., Ess. (1809) 39, non al. — *Aira elodes* Brign., Fasc. Rar. Pl. For. (1810) 10; Steud., l. c. I (1840) 44. — *Poa nemoralis* var. *vulgaris* Gaud., Agr. Helv. I (1811) 179; Mert et Koch, Deutschl. Fl. I (1823) 616; Duby, Bot. Gall. I (1828) 524; Parl., Fl. Ital. I (1848) 358; Gren.

---

(1) Exemplares números 1713 da Fl. Lusit. (Soc. Broteriana. 18.º ano) e 1619 da Fl. Lusit. Exs.

Conforme o que nos foi amàvelmente comunicado pelo Sr. Dr. A. ROZEIRA, os exemplares de *Poa nemoralis* existentes no herbário de GONÇALO SAMPAIO são precisamente os distribuídos pela Sociedade Broteriana; e, segundo o manuscrito da Flora Portuguesa ainda inédito, pertencem à var. *rigidula* M. et K. Além disso, SAMAPIO, nesse manuscrito, não indica qualquer localidade para o tipo específico, e diz para a variedade « Margens do rio Douro », o que parece comprovar que não viu exemplares portugueses típicos da espécie.

É ainda interessante assinalar que GANDOGER, Catalogue des plantes récoltées en l'Espagne et Portugal (1917) 360, cita a espécie, certamente *sensu amplo*, para Gaia (Porto) e Serra de Rebordãos (Trás-os-Montes).

Nos herbários portugueses que consultámos (COI., LISE., LISU. e PO.), não encontrámos nenhum exemplar pertencente ao tipo específico.

et Godr., Fl. Fr. III (1856) 541; Koch, Syn. Fl. Germ. et Helv. ed. 3 (1857) 698; Willk. et Lange, Prodr. Fl. Hisp. I (1861) 81; Thomé, Fl. Deutschl. I (1886) 140; Husnot, Gram. (1896-1899) 53; Asch. et Graebn., Syn. Mitteleur. Fl. II 1 (1898-1902) 408; non Reichenb., Ic. Fl. Germ. I (1834) t. 86, f. 1640. — *P. palustris* O. F. Muell. in Fl. Dan. V (1778) t. 750; DC., Fl. Fr. Suppl. (1815) 272; non L., Syst. Nat. ed. 10 (1759) 874. — *Catabrosa elodes* Roem. et Schult., l. c. 696. — *Poa nemoralis* var. *nemoralis* Coss. et Germ., Fl. Env. Par. ed. 2 (1861) 826. — *P. nemoralis* var. *genuina* Syme, Engl. Bot. XI (1872) t. 1768 (var. *vulgaris* Gaud. in textu). — *P. nemoralis* var. *typica* Fiori et Paol., Fl. Anal. Ital. I (1896-1898) 87. — *P. nemoralis* subsp. *eunemoralis* Hack. ap. Briq., Prodr. Fl. Corse I 131; *P. nemoralis* r. *debilis* Rouy, Fl. Fr. XIV (1913) 273.

« POA *(nemoralis)* panicula attenuata, spiculis sub-bifloris mucronatis, scabris, culmo incurvo ». L., l. c.

Planta vivaz, cespitosa, verde ou glaucescente, de 2-6 dm. Raiz fibrosa. Rizoma curto ou subnulo. Caules delgados, ascendentes, por vezes radicantes na base. Folhas pouco consistentes; bainha mais curta que os entrenós; lígula membranosa, truncada, muito curta ou indistinta; limbo plano, estreitamente linear, agudo. Panícula piramidal, frouxa, com os ramos verticilados nos nós inferiores, ± inclinada na parte superior. Espiguetas uni-trifloras (normalmente bifloras), ovado-lanceoladas, pequenas (de 3-4 mm. de comprimento), com os pedicelos delgados e levemente dilatados superiormente. Flores hermafroditas. Glumas subiguais, trinérveas, acuminado-lanceoladas, em regra curtamente mucronadas, menores que as flores. Glumelas pouco desiguais, a inferior oblongo-ovada, levemente emarginada, ± ciliolada inferiormente na nervura central e nas margens. Cariopse subcilíndrico-trigonal. (V. v.).

Floração: Maio-Julho. (1).

Habitat: Lugares arenosos sombrios. Bragança.

---

(1) Referimo-nos à época normal de floração na Península Ibérica.

Espécimes: Fonte do Jorge (Bragança), 6-6-1943, *P.ᵉ A. Carneiro* 432, COI.

Distribuição: Trás-os-Montes.

Exsiccata: FRANÇA: S. Claud, 6-1880, *leg.* ? in Fl. Gall. (Mus. S. Fiel); Allier-Villeneuve, 30-7-1898, *S. E. Lassimonne* in Gall, med. fl. exs. 821 ser. 2. — ALEMANHA: Harz, Bodethal, 8-7-1884, *Dr. O. Hoffmann* in Fl. hercyn. s. n.; Walder, Gebüsche, häufig, Görlitz, Jun.-Jul., *leg.* ? 35; Oberglogau, in den «Erlen», 8-7-1893, *Richter* in A. Callier, Fl. Sil. exs. (ed. 1893) 992; auf trockenem Sandboden im Hardtwald (Laubmischwald) bei Karlsruhe, ca. 120 m. ü. d. M., 11-6-1901, *A. Kneucker*, Gram. exs. 268. — ITÁLIA: in pascuis alpinis montis Morrone (inter Juniperus), Aprutii, 21-7-1856, *E.* et *A. Huet du Pavillon* in Pl. Neapolit. 434. — SICÍLIA: in nemoribus montosis, Valdemone, Junio, *Todaro*, Fl. Sicula Exs. 1417. — ÁUSTRIA: St. Poelten in Austr. inf. in nemorosis, 6-1878, *Hackel* s. n. — CHECO-ESLOVÁQUIA: Weisse Karpaten: Wald C. Vibooce, 6-1937, *H. Laus* in Fl. v. Süd-Mähren s. n. — JUGO-ESLÁVIA: Nevesinje, in silvis montis Velez, alt. 1000 m. s. m., 18-7-1895, *A. Raap* in Pl. Herceg. exs. 247. — ROMÉNIA: Mauern und Felsen bei Herkulesbad im Banat., Kalk, ca. 100 m. ü. d. M., 10-6-1902, *Richter* in A. Kneucker, Gram. exs. 268 a. — DINAMARCA: Sjoll, Jonstrup Vaug, 15-6-1896, *H. Mortensen* s. n. — SUÉCIA: Ormesb. Swan., 1873, *Hylt. Cav.* in Fl. Scand. s. n. — FINLÂNDIA: Tavastia australis, par. Tyrväntö, Mälkiäinen, Kariniemi, in margine fossae, 10-7-1933, *K. Linkola* in Pl. Finl. Exs. 1053. — ESCÓCIA: Perth, 8-1851, *John T. Syme*, Bot. Soc. Lond. 1334. — ISLÂNDIA: Island, 23-7-1888, *Stefanst.* s. n.

Ecologia e distribuição geográfica: *Poa nemoralis* L. prefere os terrenos umbrosos dos bosques, onde constitue uma boa forragem espontânea.

A sua área geográfica compreende quase toda a Europa, o Norte de África, a Ásia média e setentrional, e a América do Norte, sendo, no entanto, rara em diversos países, entre os quais se contam Espanha e Portugal.

TRITICUM L.

Triticum triunciale (L.) Gren. et Godr.

Gonçalo Sampaio (1910) e Pereira Coutinho (1913 e 1939) indicam para esta espécie a parte do país que vai do Douro ao Algarve, quando é certo que a planta tem sido colhida em Trás-os-Montes por diversos herborizadores. (V. s.).

Espécimes: arredores de Bragança, 10-6-1941, *P.e A. Carneiro* 68, COI. (1).

Distribuição: Trás-os-Montes, Alto Douro, Douro Litoral e províncias ao sul do Douro.

CYPERACEÆ

CAREX L.

Carex Reuteriana Boiss.

Pereira Coutinho (1939) menciona para esta espécie as regiões das Serras do Gerez, Soajo, Caramulo e Estrela, e ainda as margens do Guadiana. No entanto, a planta tem sido herborizada em outra região da Beira e também no Douro Litoral e em Trás-os-Montes.

A existência de *C. Reuteriana* Boiss. nestas últimas províncias vem confirmar o modo de ver de F. A. Mendonça e E. P. Sousa (1933) relativamente à área de dispersão desta espécie no nosso país (2). (V. v.).

Espécimes: Montalegre, 30-5-1939, *Rothmaler* et *P. Silva* 15653, LISE. 5570; arredores de Bragança, 10-5--1941, *P.e A. Carneiro* 17, COI.; Valongo, 25-5-1939, *Rothmaler* 14708, LISE. 5909; entre Figueiró dos Vinhos

---

(1) Não mencionamos os exemplares citados por outros autores.

No Anuário da Sociedade Broteriana IX (1943) 20, em vez de «Nova região», deve ler-se «Região não mencionada por PEREIRA COUTINHO (1939)».

(2) *Vide* Bol. Soc. Broteriana sér. 2 VIII (1933) 160.

e Sernache do Bonjardim, 20-4-1935, *F. A. Mendonça* e *F. Sousa*, COI. 2838.

Distribuição: Minho, Trás-os-Montes, Douro Litoral, Beira Alta, Beira Baixa e (sec. COUT., 1939) margens do Guadiana.

LILIACEÆ

GAGEA Salisb.

Gagea pratensis (Pers.) R. et Sch. subsp. nova Samp.

No seu trabalho « A flora do concelho de Vimioso », 3.ª lista, MIRANDA LOPES diz o seguinte: « Descobri esta linda e delicada planta em 2 de Março de 1926, em Pinelo, no lameiro de José da Fonte, margens da Ribeirinha » (1). No entanto, na etiqueta original do exemplar mais antigo desta subespécie, agora registado, lê-se claramente a data 28-2-1926, que deve corresponder à da descoberta da planta.

PEREIRA COUTINHO (1939) dá para esta subespécie as seguintes indicações: « Março. Vimioso: Pinelo ». Note-se, porém, que MIRANDA LOPES colheu também belos exemplares em Argoselo. Mais recentemente, o Sr. P.ᵉ A. CARNEIRO herborizou esta interessante liliácea em Meixedo (Bragança). A área conhecida de distribuição da planta fica, pois, situada nos concelhos de Bragança e Vimioso.

Observe-se ainda que a época de floração desta liliácea fica compreendida entre Fevereiro e Abril. (V. v.).

Espécimes: Meixedo, nos matos, 3-4-1944, *P.ᵉ A. Carneiro* 436, COI.; Pinelo: lameiros do Pontão da Ribeirinha, 28-2-1926, *P.ᵉ Miranda Lopes* 738, COI.; Pinelo, 15-3-1929, *P.ᵉ Miranda Lopes* s. n., COI.; Pinelo, 8-4-1930, *P.ᵉ Miranda Lopes* 738, COI.; Argoselo, à beira do caminho dos Lameiros do Ferradal, no Lameiro do Cabeço dos Carrascos, 28-3-1933, *P.ᵉ Miranda Lopes* s. n., COI.

Distribuição: Trás-os-Montes.

---

(1) *Vide* Bol. Soc. Broteriana, sér. 2 VI (1929-1930) 272.

(2) *Vide* Bol. Soc. Broteriana XIII (1896) 12'.

TULIPA L.

Tulipa australis Link var. transtagana (Brot.) Cout.

Esta variedade não se encontra sòmente no Alentejo e Algarve, como refere Pereira Coutinho (1939). Este autor, no seu trabalho As Liliaceas de Portugal (1), registara para a planta também as regiões do Centro litoral (Cabo Espichel, *Welwistsch)* e Alendouro trasmontano (Bragança, *M. Ferreira).* A existência desta liliácea em Trás-os-Montes vem a ser confirmada, mais uma vez, pelas recentes herborizações do Sr. P.e Barros Carneiro. (V. s.).

Espécimes: arredores de Bragança, 7-5-1941, *P.e A. Carneiro* 107, COI.

Distribuição: Trás-os-Montes, Estremadura, Alentejo e Algarve.

SCILLA L.

Scilla verna Huds.

Pereira Coutinho (1939) considera duvidosa a existência do tipo desta espécie no nosso país, dizendo «Alto Minho e Alto Trás-os-Montes?».

Depois de estudarmos o material dos herbários portugueses, parece-nos podermos afirmar que a planta existe não só nas «regiões montanhosas, ao norte do país», como diz Gonçalo Sampaio (1910), mas também nas Beiras Alta e Litoral. (V. v.).

Espécimes: Serra do Caramulo, 6-1884, *J. Henriques* s. n., COI.; Arrifana (Guarda), 22-4-1943, *J. G. Garcia* 85, COI.; Quinta do Picado (Aveiro), 15-4-1898, *J. T. Lebre* s. n., COI.; Serra da Ponte da Mucela, 4-1883, *M. Ferreira* s. n., COI. (2).

---

(1) *Vide* Bol. Soc. Broteriana XIII (1896) 127.

(2) PEREIRA COUTINHO, no seu trabalho As Liliaceas de Portugal (1896), considera os exemplares colhidos por J. HENRIQUES e M. FERREIRA como pertencentes à var. *major* Boiss., sinónima de *Scilla Ramburei* Boiss. O estudo minucioso destes espécimes e ainda de outros provenientes das regiões mencionadas por GONÇALO SAMPAIO (1910) levou-nos, porém, a crer que se trata, realmente, do tipo de *Scilla verna* Huds.

Distribuição: Minho, Trás-os-Montes, Beira Alta e Beira Litoral.

Exsiccata: — ESPANHA: Oña, 1881, *J. Arraiano* s. n. in Fl. Hisp. (Mus. S. Fiel); Guipuzcoa: Cabo Higuer, 4-1895, *Gandoger* in Fl. Hisp. exs. 88. — FRANÇA: Bois des Bouls, Commune de Pamproux (Deux Sèvres), 1-5-1884, *B. Souché* in F. Schultz Herb. norm. 1872; pr. Pamproux (Deux Sèvres), 19-6-1884, *B. Souché* s. n. in Herb. L. Giraud, Pl. Fr. — INGLATERRA: Suanbister, Orkney, 6-1849, *J. T. Syme*, Bot. Soc. Lond. 1091; Cornwall: Lizard Downs, 5-1935, *A. W. Exell* in Fl. Engl. 1011 ex Herb. Mus. Brit.

Scilla hispanica Mill. var. **patula** (DC.) Cout.

Esta variedade tem sido herborizada no Minho e Alto Douro, regiões não mencionadas por PEREIRA COUTINHO (1939), que indica para a planta apenas a Serra da Gardunha e o Alto Alentejo. (V. s.).

Espécimes: Póvoa-de-Lanhoso, 12-4-1898, *A. Martins* s. n., COI.; Armil (Fafe), 18-4-1941, *P.^e A. Carneiro* 106, COI.; Lamego, 4-1898, *A. Pereira* s. n., COI.

Distribuição: Minho, Alto Douro, Beira Baixa e Alto Alentejo.

Scilla non scripta (L.) Hoffgg. et Link

PEREIRA COUTINHO (1939) menciona para esta espécie as regiões da Beira central e Alentejo litoral, com indicação de pouco frequente. Verifica-se, no entanto, que o tipo específico existe nas Beiras trasmontana e litoral, e ainda na Estremadura e Alto Alentejo. (V. v.).

Espécimes: Eira Cimeira pr. Arrifana (Guarda), 22-4-1943, *J. G. Garcia* 73, COI.; Coimbra, 22-3-1939, *Rothmaler* e *P. Silva* 14629, LISE. 6409; Porto de Moz, 21-3-1939, *Rothmaler* 14625, LISE. 6408; Portalegre: Ribeira de Niza, 4-1880, *leg. ?*, LISE. 3704.

Distribuição: Beira Alta, Beira Litoral, Estremadura, Alto Alentejo e Alentejo Litoral.

MUSCARI Mill.

Muscari racemosum (L.) Mill.

Segundo Pereira Coutinho (1939) esta espécie existe nas regiões do centro e sul do país. No entanto, a planta foi também herborizada em Trás-os-Montes (distrito de Bragança, *G. Sampaio* (1) e *P.e A. Carneiro;* distrito de Vila Real, *A. Pavão),* o que está de acordo com a citação de Gonçalo Sampaio (1910), que diz: «De Traz dos Montes ao Algarve». (V. v.).

Espécimes: Bragança: Mãe de Água, terrenos incultos, 10-4-1943, *P.e A. Carneiro* 434, COI.; Abaças (Vila Real), 3-1914, *A. Pavão* s. n., COI.

Distribuição: Trás-os-Montes e províncias ao sul do Douro.

IRIDACEÆ

CROCUS L.

Crocus carpetanus Boiss. et Reut.

A área de dispersão desta espécie no nosso país compreende não sòmente as regiões indicadas por Gonçalo Sampaio (1910) e Pereira Coutinho (1939) — Serras de Rebordãos, Gerez e Estrela —, mas também outras zonas montanhosas dos distritos de Vila Real, Guarda e Castelo Branco. (V. v.).

Espécimes: Montalegre, 3-1940, *B. de Oliveira,* LISE. 6551; Arrifana (Guarda): carreiro da Rapoula, 7-3-1943, *J. G. Garcia* 133, COI.; S. Fiel, 2-1901, *J. S. Tavares* s. n., COI.; entre o Galo e a Pirâmide, Gardunha, s. d., *Zimmermann* s. n. ex. Herb. S. Fiel, COI.

Distribuição: Minho, Trás-os-Montes, Beira Alta e Beira Baixa.

---

(1) *Vide* A. ROZEIRA in Mem. Soc. Broteriana III (1944) 79.

POLYGONACEÆ

POLYGONUM L.

Polygonum orientale L.

Segundo o que nos foi comunicado pelo Sr. P.e Barros Carneiro, esta espécie é subespontânea em Armil (Fafe), junto ao rio que atravessa a freguesia. Pereira Coutinho (1939) cita a planta apenas para os arredores de Bragança. (V. v.).

Espécimes: Armil (Fafe), 1-8-1942, *P.e A. Carneiro* 266, COI.

Distribuição: Minho e Trás-os-Montes.

AMARANTHACEÆ

AMARANTHUS L.

Amaranthus hypochondriacus L.

Pereira Coutinho (1939) não faz referência a esta espécie, mas Gonçalo Sampaio (1910) indica-a como naturalizada no Baixo Alentejo litoral. Em Setembro de 1943, porém, o Sr. Dr. Pinto Lopes colheu exemplares subespontâneos da planta nas proximidades de Caldas da Rainha (1). (V. s.).

Espécimes: Santa Catarina pr. Caldas da Rainha, 9-1943, *Pinto Lopes* s. n., COI.

Distribuição: Estremadura e Baixo Alentejo.

Amaranthus patulus Bert. var. incurvatus (Gren. et Godr.) Arcang.

Esta variedade não é mencionada por Pereira Coutinho (1939), embora Gonçalo Sampaio (1910) a indique para o

(1) *Vide* Anuário Soc. Broteriana IX (1943) 34.

sul do país. Em Setembro de 1943, a planta foi herborizada pelo Sr. Dr. Pinto Lopes, perto de Caldas da Rainha (1). (V. s.).

Espécimes: Santa Catarina pr. Caldas da Rainha, 9-1943, *Pinto Lopes* s. n., COI.

Distribuição: Estremadura e (*sec.* Sampaio, 1910) sul do país.

CARYOPHYLLACEÆ

SPERGULA L.

Spergula pentandra L. subsp. **genuina** Cout. var. **punctata** Cout.

Em 1941, o Sr. P.e Barros Carneiro colheu exemplares desta variedade em Trás-os-Montes. Em 1943 e 1944 a planta foi também herborizada por nós e pelo Sr. Prof. Dr. A. Fernandes na Beira Alta. Pereira Coutinho (1939) indica apenas para esta variedade as regiões do Minho e Alto Alentejo. (V. v.).

Espécimes: arredores de Bragança, 20-3-1941, *P.e A. Carneiro* 6, COI.; Quinta do Prado pr. Guarda, 4-1944, *A. Fernandes* s. n., COI; Eira Cimeira pr. Arrifana (Guarda), 22-4-1943, *J. G. Garcia* 107, COI.

Distribuição: Minho, Trás-os-Montes, Beira Alta e Alto Alentejo.

SAGINA L.

Sagina maritima D. Don.

Pereira Coutinho (1939) menciona para o tipo desta espécie as areias e rochedos do litoral do Minho e Estremadura (Estoril), quando é certo que a planta foi também herborizada em Vila-do-Conde (1901, *G. Sampaio)*, Leça-da-Palmeira (1901, *G. Sampaio)*, Matosinhos (1898, *G. Sampaio)*, pr. Foz do Douro (1899, 1901, *G. Sampaio)*,

(1) *Vide* Anuário Soc. Broteriana IV (1943) 34.

Costa da Trafaria (1888, *J. Daveau)* e campos de Setúbal (1901, *A. Luisier)*. Além disso, desde 1930 que o serviço de troca de sementes do Instituto Botânico Dr. Júlio Henriques vem colhendo material do referido tipo na Figueira da Foz (1). Esta distribuição da planta está, até certo ponto, de acordo com a indicação «Beira-mar, de norte a sul», dada por GONÇALO SAMPAIO (1911). (V. v.).

Espécimes: Figueira da Foz, 4-4-1943, *F. Sousa* s. n., COI.

Distribuição: regiões litorais do Minho, Douro, Beira e Estremadura.

SILENE L.

Silene acutifolia Link

Para esta espécie, além das regiões mencionadas por PEREIRA COUTINHO (1939) — Alto Minho e Serras do Gerez, Marão, Caramulo, Estrela, Buçaco e Louzã —, temos a considerar o Alto Alentejo, onde a planta foi herborizada em 1914 por MANUEL FERREIRA. (V. s.).

Espécimes: entre Montalvão e Ribeira de Niza, 6-1914, *M. Ferreira* s. n., COI.

Distribuição: Minho, Trás-os-Montes, Beira Alta, Beira Litoral, Beira Baixa e Alto Alentejo.

VELEZIA L.

Velezia rigida L.

Em Agosto de 1944 o Sr. JÚLIO DE MATOS trouxe-nos de Brasfemes (Coimbra) alguns exemplares desta espécie, o estudo dos quais nos permitiu verificar que PEREIRA COUTINHO (1939) não indica para ela a Beira Litoral, como não se refere a outras regiões onde a planta tem sido herborizada, tais como o Douro Litoral e o Algarve. (V. v.).

---

(1) *Vide* Index Seminum do Instituto Botânico da Universidade de Coimbra, para os anos de 1931, 1932, 1934, 1935, 1937, 1938 e 1944.

Espécimes: Areinho de Valbom, 30-5-1882, *J. Tavares* s. n., PO.; Porto, 5-1899, *Vasco d'Oliveira* s. n., COI.; Coimbra: Penedo da Saudade, 6-1883, *M. Ferreira* s. n., COI.; *Ibid.*, 7-1886, *M. Ferreira* in Fl. Lusit. Exs. 178, COI.; *Ibid.*, 7-1894, *leg. ?* s. n., PO.; Brasfemes pr. Coimbra, 16-8-1944, *J. Matos* s. n., COI.; Faro, *C. Mach.* (cit. MARIZ in Bol. Soc. Broteriana V, 1887, p. 123).

Distribuição: Trás-os-Montes, Alto Douro, Douro Litoral, Beira Alta, Beira Litoral, Beira Baixa, Estremadura, Alentejo e Algarve.

Não tomando em conta a província do Ribatejo, esta distribuição está de acordo com a indicação dada por GONÇALO SAMPAIO (1911), que diz: «De Traz dos Montes ao Algarve».

CRUCIFERÆ

ERYSIMUM L.

Erysimum linifolium (Pers.) Gay

Em fins de Abril de 1943, colhemos um exemplar pertencente ao tipo desta interessante espécie no limite norte do concelho do Sabugal, — portanto, em uma região não mencionada por PEREIRA COUTINHO (1939) —. Este autor indica para a planta apenas as regiões do Minho, Trás-os-Montes e Serra da Estrela. GONÇALO SAMPAIO (1910) inclui na área de dispersão da planta regiões onde, de facto, o tipo específico tem sido herborizado. (V. v.).

Espécimes: Areinho de Avintes, 14-5-1883, *J. Tavares* s. n., PO.; *Ibid.*, 4-1898, *Sampaio* s. n., PO.; Adorigo (Tabuaço), 4-1882, *E. Schmitz* in Fl. Lusit. 424, COI.; Pinhel, 5-1891, *J. M. R. Costa* s. n., COI.; Cerdeira (Sabugal), 27-4-1943, *J. G. Garcia* 142, COI. (1).

Distribuição: Minho, Trás-os-Montes, Alto Douro, Douro Litoral, Beira Alta e Beira Baixa.

---

(1) A. ROZEIRA e J. CASTRO colheram também exemplares pertencentes a esta espécie em S. João da Pesqueira e Barca de Alva. (*Vide* Mem. Soc. Broteriana III, 1944, p. 103).

ALYSSUM L.

Alyssum psilocarpum Boiss.

Esta curiosa espécie, que era apenas conhecida dos concelhos de Bragança (*G. Sampaio* e *P.e A. Carneiro*), Vimioso (*P.e Miranda Lopes*), Miranda do Douro (*A. T. Morais*) e Sabugal (*A. F. Vaz*), foi por nós herborizada no concelho de Almeida, em Abril de 1943. (V. v.).

Espécimes: Miuzela (Almeida), 17-4-1943, *J. G. Garcia* 138, COI.

Distribuição: Trás-os-Montes e Beira Alta.

SAXIFRAGACEÆ

SAXIFRAGA L.

Saxifraga hypnoides L. subsp. **continentalis** Engl. et Irmsch. var. **lusitanica** Lange

Obs: Os exemplares n.os 171 e 172 da colecção do Rev. Barros Carneiro, determinados pela Flora de Portugal de Pereira Coutinho (1939), foram designados pelo binome de *S. hypnoides* L. no Anuário da Sociedade Broteriana IX (1943) 23, mas pertencem, sem dúvida, como o n.º 173, à var. *lusitanica* Lange (= var. *pungens* Engl. et Irmsch.). A espécie é de tipo polimorfo, e as plantas que Pereira Coutinho (1939) indica como tipo específico só podem pertencer à subespécie acima referida — a única existente no nosso país, onde está representada pelas variedades *lusitanica* Lange e *cantabrica* Engl. et Irmsch. (1). (V. v.).

---

(1) Cf.: Das Pflanzenreich IV 117 I (1916) 342-343; ROTHMALER et PINTO DA SILVA in Agron. Lusit. II (1940) 89.

PAPILIONACEÆ

TRIGONELLA L.

Trigonella monspeliaca L.

Segundo Pereira Coutinho (1939), a área de distribuição desta espécie compreende apenas Trás-os-Montes, Estremadura e Algarve. Por isso, vimos assinalar o facto de a planta ter sido encontrada na Beira Litoral e no Alto Alentejo. (V. s.).

Espécimes: Carreira do Tiro pr. Coimbra, 15-5-1932, *F. Sousa* s. n., COI.; arredores de Reguengos de Monsaraz: Herdade dos Perdigões, 5-1911, *Dr. Ruy Palhinha* e *F. Mendes* s. n., LISU.

É muito provável que a área de dispersão desta espécie se estenda pelas diversas regiões que vão «de Bragança ao Algarve», como refere Gonçalo Sampaio (1911). No entanto, não vimos, nos herbários que consultámos, exemplares de todas essas regiões.

TRIFOLIUM L.

Trifolium nigrescens Viv.

Não obstante Gonçalo Sampaio (1911) indicar para esta espécie as regiões do centro e sul do país, Pereira Coutinho (1939) cita-a apenas para a Estremadura, Alentejo litoral e Baixo Alentejo. A planta foi, de facto, herborizada no Douro Litoral, Beira Litoral, Ribatejo e Alto Alentejo. (V. v.).

Espécimes: Valbom de Gondomar (Porto), 21-5-1944, *J. L. Fonseca* 162, COI.; arrozais pr. Cacia (Aveiro), 8-1926, *A. Monteiro* e *A. Passos*, LISE. 1197; Coimbra ao norte da estrada de S. José, 2-4-1943, *J. G. Garcia* 109, COI.; Mata de Foja (Montemor-o-Velho), 19-6-1936, *F. Sousa* s. n., COI.; Figueira da Foz, junto ao Forte, 4-4-1943,

F. Sousa s. n., COI.; Escola Agrícola de Santarém, 5-1926, *A. Passos*, LISE. 785; pr. Reguengos de Monsaraz: Barrocal, 4-1908, *R. Palhinha* e *F. Mendes* s. n., LISU.

Distribuição: Douro Litoral, Beira Litoral, Estremadura, Ribatejo e Alentejo.

Trifolium maritimum Huds.

Esta espécie tem sido encontrada na Beira Litoral (entre Coimbra e Figueira da Foz), região não mencionada por PEREIRA COUTINHO (1939), que a cita para a Estremadura, Alentejo e Algarve, mas incluída na zona que vai «de Aveiro ao Algarve», indicada por GONÇALO SAMPAIO (1911) (1). (V. v.).

Espécimes: Carreira do Tiro pr. Coimbra, 28-5-1943, *J. Matos* s. n., COI.

Distribuição: Beira Litoral, Estremadura, Alentejo e Algarve.

ASTRAGALUS L.

Astragalus glycyphyllus L.

Esta espécie, que era sòmente conhecida do Fundão, foi encontrada em Trás-os-Montes durante uma excursão de estudo chefiada pelo saudoso Prof. Dr. LUIZ CARRISSO. (V. s.).

Espécime: Ferragosa de Milhões, margem do ribeiro, estrada de Vimioso a Bragança, 19-6-1932, *Carrisso* e *Mendonça*, COI. 2440.

Distribuição: Trás-os-Montes e Beira Baixa.

VICIA L.

Vicia villosa Roth

Em Maio de 1943, durante uma exploração botânica na Serra da Estrela, tivemos oportunidade de colher um

---

(1) Este botânico herborizou a planta em Ílhavo, no ano de 1901.

exemplar pertencente ao tipo desta espécie em uma seara situada junto de Manteigas, à esquerda da estrada que liga esta vila com a cidade da Guarda.

Pereira Coutinho (1939) não menciona esta planta (1). Gonçalo Sampaio (1911) menciona-a como espécie adventícia, não indicando para ela qualquer localidade. No entanto, no herbário deste botânico encontra-se um exemplar da referida espécie, colhido no Porto.

Segundo Rouy, Flore de France V (1899) 237, *V. villosa* Roth é uma planta da Europa setentrional (não boreal), central e oriental, observando-se em algumas localidades da França, nas searas, como adventícia ou subespontânea. Willkomm e Lange, Prodromus Floræ Hispanicæ III (1880) 304, indicam-na como planta rara. (V. v.).

Fl. e fr.: Maio-Setembro.

Espécimes: Porto, s. d., *G. Sampaio* s. n., PO.; inter segetes pr. Manteigas, 6-5-1943, *J. G. Garcia* 233, COI.

Distribuição: Douro Litoral e Beira Alta.

Exsiccata: ESPANHA: Algeciras, locis rupestribus, 9-5-1873, *R. Fritze* s. n. in Reise durch das südliche Spanien. — RÚSSIA: Cherson, 6-1865, *Ed. Lindmann* s. n.

LATHYRUS L.

Lathyrus Cicera L. var. sub-bijugus Cout.

Esta variedade, até agora apenas conhecida de Caparide e Alcácer do Sal, foi encontrada em 1941 pelo Rev. Barros Carneiro nos arredores de Bragança. (V. s.).

Espécimes: arredores de Bragança, 15-5-1941, *P.e A. Carneiro* 114, COI. (2).

Distribuição: Trás-os-Montes, Estremadura e Baixo Alentejo.

---

(1) Este autor, porém, refere-se a *Vicia dasycarpa* Ten., que SAMPAIO (1911) considera raça de *V. villosa* Roth.

(2) *Vide* Anuário Soc. Broteriana IX (1943) 25.

CISTACEÆ

HELIANTHEMUM Adans.

Helianthemum ægyptiacum (L.) Mill.

Pereira Coutinho (1939) indica para esta espécie as regiões de Trás-os-Montes, Beira meridional, Alto Alentejo, Alentejo litoral e Algarve. Observe-se, porém, que a planta tem sido herborizada também no Alto Douro, Douro Litoral e Beira Alta, o que se harmoniza, em parte, com a indicação dada por Gonçalo Sampaio (1910), que diz: «De Bragança ao Algarve». (V. v.).

Espécimes: Adorigo, 5-1890, *Schmitz* s. n., LISU.; Porto, 4-1899, *V. N. d'Oliveira* s. n., COI.; Pinhel, 5-1891, *J. M. R. Costa* s. n., COI.; Junça (Almeida), 6-1890, *M. Ferreira* s. n., COI.; Vilar Formoso, 6-1890, *M. Ferreira* s. n., COI.; Cerdeira (Sabugal), 27-4-1943, *J. G. Garcia* 148, COI. (1).

Distribuição: Trás-os-Montes, Alto Douro, Douro Litoral, Beira Alta, Beira Baixa, Alentejo e Algarve.

Helianthemum polifolium (L.) DC. var. apenninum (L.)

A Flora de Portugal de Pereira Coutinho (1939) indica para esta variedade apenas a Beira trasmontana. A planta parece, porém, ter sido encontrada também na região de Bragança pelo próprio autor da Flora (2), e, recentemente, o Sr. P.e Barros Carneiro herborizou-a, de facto, nessa região. (V. s.).

Espécimes: arredores de Bragança, 26-5-1941, *P.e A. Carneiro* 21, COI.

Distribuição: Trás-os-Montes e Beira Alta.

(1) Foram também herborizados exemplares em Barca de Alva (Figueira do Castelo Rodrigo) por A. ROZEIRA e J. CASTRO. *Vide* A. ROZEIRA, in Mem. Soc. Broteriana III (1944) 96.

(2) *Vide* A. ROZEIRA, *ibidem*.

LYTHRACEÆ

LYTHRUM L.

Lythrum Hyssopifolia L.

Em Julho de 1944, quando procedíamos à classificação de exemplares do género *Lythrum* colhidos na Gala (Figueira da Foz), verificámos que entre eles se encontrava *L. Hyssopifolia* L., embora aquela localidade não pudesse ser incluída nas regiões mencionadas por PEREIRA COUTINHO (1939) para esta espécie. Procedendo à revisão do material de herbário relativo à planta em questão, concluímos que ela se encontra também em Trás-os-Montes, Douro Litoral, Beira Alta, Beira Litoral, Beira Baixa, Alentejo e Algarve. No seu trabalho Esboço da Flora da Bacia do Mondego, JÚLIO HENRIQUES (1911) faz também referência a esta espécie (1). (V. v.).

Espécimes (2): Chaves, 7-1892, *A. Moller* s. n., COI.; Serra da Brunheira (Chaves), 7-1892, *A. Moller* s. n., COI.; Picote (Miranda do Douro), 6-1888, *J. Mariz* s. n., COI. (3); Porto, margem do Douro, 5-1898, *G. Sampaio* in Fl. Lusit. Exs. 1565, COI. (4); Lameiras, Mido, 7-1884, *A. R. da Cunha* s. n., LISU.; Gafanha (Aveiro), 5-1895, *Mesquita* s. n., COI.; Lagoa da Vela (entre Mira e Figueira da Foz), 24-6-1865, *A. Carvalho* s. n., COI.; Gala (Figueira da Foz), 19-7-1944, *J. Matos* s. n., COI.; Quinta da Azenha V.ª (Montemor-o-Velho), 7-1892, *M. Ferreira* s. n., COI.; Mainça (Coimbra), 6-1877, *M. Ferreira* s. n., COI.; Paúl de S. Fagundo (Coimbra), 9-1877, *M. Ferreira* s. n., COI.; Miranda do Corvo, 6-1883, *Balth. Mello* s. n., COI.; Castelo Branco, 16-6-1938, *Rothmaler* 13640, LISE. 4635;

(1) *Vide* Bol. Soc. Broteriana XXVI (1911) 159.

(2) Exemplares das regiões não indicadas por PEREIRA COUTINHO (1939).

(3) *Vide* Bol. Soc. Broteriana VII (1889) 64.

(4) *Ibidem* XVI (1899) 83.

Malpica, 6-1881, *A. R. da Cunha* s. n., LISU.; Malagueiro, Santarém, 9-1888, *A. R. da Cunha* s. n., LISU.; Sinceira (Monchique), 6-1892, *J. Brandeiro* s. n., COI.; Vila Real de Santo António, 4-1888, *A. Moller* s. n., COI.

Distribuição: Trás-os-Montes, Douro Litoral e províncias ao sul do Douro.

UMBELLIFERÆ

CONOPODIUM Koch.

Conopodium ramosum Cost.

Esta espécie, que Pereira Coutinho (1939) cita apenas para as regiões da Beira central e meridional e Alto Alentejo, foi também herborizada no Minho e Douro Litoral. (V. s.).

Espécimes: Armil (Fafe), 7-7-1941, *P.e A. Carneiro* 186, COI. (1); Serra do Pilar, 5-1899, *G. Sampaio* s. n., PO.; Serra de Valongo, 5-1908, *Albuquerque* s. n., PO.

Distribuição: Minho, Douro Litoral, Beira Alta, Beira Baixa e Alto Alentejo.

ŒNANTHE L.

Œnanthe Lachenalii Gmel.

A área de distribuição desta espécie prolonga-se pelos terrenos úmidos e salgadiços da Beira Litoral, para o norte das regiões mencionadas por Pereira Coutinho (1939). (V. v.)

Espécimes: Lares pr. Figueira da Foz, 8-9-1942, *F. Lemos* s. n., COI.

Distribuição: Beira Litoral, Estremadura, Baixo Alentejo e Algarve.

---

(1) *Vide* Anuário Soc. Broteriana IX (1943) 26.

BORRAGINACEÆ

ECHIUM L.

Echium plantagineum L.

Em Maio de 1943, durante uma exploração botânica realizada através da Beira, tivemos ensejo de herborizar na Guarda duas interessantes formas desta espécie, uma das quais foi também colhida na Quinta do Prado (Guarda) pelo Sr. Prof. Dr. A. Fernandes:

1 — forma **megalanthum** (LaPeyr.) nob., nova comb., Ic. nostra t. III; *E. grandiflorum* LaPeyr., Hist. Abr. Pl. Pyr. (1813) 90 (1), non Salisb., Prodr. Stirp. (1796) 115, nec al.; *E. megalanthos* LaPeyr., l. c., Suppl. (1818) 29; *E. plantagineum* subvar. *megalanthum* Rouy, Fl. Fr. X (1908) 308; *E. plantagineum* forma *albiflorum* Fiori in Fiori et Paol., Fl. Anal. Ital. II (1900-1902) 366. — Corolla alba, ad 3 cm. longa. (V. v.).

Espécime: Guarda: Quinta da Vacaria, 5-5-1943, *J. G. Garcia* 225, COI. (2).

Desta planta encontrámos um único exemplar, particularmente robusto (com cerca de 60 cm. de altura), entre milhares de indivíduos correspondentes ao tipo específico (Est. III).

Distribuição: Beira Alta.

2 — forma **cyaneiflorum** nob., forma nova, Ic. nostra t. IV. — Corolla pulchre cyanea, ad 3 cm. longa. (V. v.).

Espécimes: Guarda, Bonfim pr. Moinho de Vento, 5-5-1933, *J. G. Garcia* 212 (typ.), COI.; Quinta do Prado pr. Guarda, 4-1944, *A. Fernandes* s. n., COI.

Esta forma fica representada por exemplares de vilosidade bastante acentuada e caule simples ou pouco ramoso, de 15-35 cm. de altura (Est. IV).

Distribuição: Beira Alta.

---

(1) A data do prefácio desta obra é de 1812, e a do frontispício de 1818. Segundo JACKSON (Guide to the Literature of Botany, 1881), 1818 corresponde à data do suplemento, sendo a da obra de 1813.

(2) Este exemplar encontra-se dividido por duas folhas de herbário, *a* e *b*.

Obs. — Relativamente à cor da corola, as duas formas parecem marcar as posições extremas da variabilidade que se observa nos diversos indivíduos da mesma espécie, e que é, certamente, determinada por factores mendelianos. O aparecimento de tais plantas em uma numerosa população do tipo específico está em perfeita concordância com a nossa hipótese.

Pereira Coutinho (1939), na chave dicotómica que conduz à determinação de *E. plantagineum* L. e *E. gaditanum* Boiss., parece referir-se indirectamente a estas duas formas, dizendo: «corola azul... poucas vezes branca».

LABIATÆ

SALVIA L.

Salvia Verbenaca L.

Pereira Coutinho (1939) menciona para esta espécie as regiões da Beira e Centro litorais, Alentejo e Algarve, mas não faz referência a Trás-os-Montes e Beira Alta, onde foram colhidos exemplares que pertencem indubitàvelmente ao tipo específico. (V. s.).

Espécimes: arredores de Bragança, 14-5-1941, *P.e A. Carneiro* 102, COI.; Celorico-da-Beira, no interior das muralhas, 5-1933, *Carrisso e Mendonça*, COI. 3328 (1).

Distribuição: Trás-os-Montes, Beira Alta, Beira Litoral, Estremadura, Alentejo e Algarve.

PLANTAGINACEÆ

PLANTAGO L.

Plantago Loeflingii L.

Esta curiosa e rara espécie era apenas conhecida de Trancoso, Barca-de-Alva e Vimioso. Ùltimamente, foi

(1) *Vide* Bol. Soc. Broteriana sér. 2 IV (1927) 150; Anuário Soc. Broteriana IX (1943) 27; Mem. Soc. Broteriana III (1944) 168.

herborizada pelo Rev. Barros Carneiro, nas proximidades de Bragança. (V. v.).

Espécimes: Sapato (arredores de Bragança), terrenos incultos, 4-4-1944, *P.ᵉ A. Carneiro* 435, COI.
Distribuição: Trás-os-Montes, Alto Douro e Beira Alta.

COMPOSITÆ

ANACYCLUS L.

Anacyclus clavatus (Desf.) Pers.

Segundo Pereira Coutinho (1939), esta composta, bastante rara no nosso país, era apenas conhecida de Miranda do Douro, Minho e Beira Trasmontana. Em 1941, porém, foi herborizada pelo Rev. Barros Carneiro nos arredores de Bragança. (V. s.).
Espécimes: Arredores de Bragança, 9-6-1941, *P.ᵉ A. Carneiro* 32, COI.

PHALACROCARPUM Willk.

Phalacrocarpum oppositifolium (Brot.) Willk. forma macrocephalum Willk.

Entre os exemplares de *Phalacrocarpum oppositifolium* (Brot.) Willk. herborizados por nós na Serra da Estrela, destaca-se um, particularmente notável pelo tamanho dos capítulos, os quais atingem 53 mm. de diâmetro. Este exemplar pertence, sem dúvida, à forma *macrocephalum* Willk. (1).

---

(1) Willkomm (l. c.) considera em *Phalactocarpum oppositifolium* três formas: *commune*, *macrocephalum* e *leptophyllum*. A primeira, correspondente ao tipo específico, tem os capítulos de 3-4 cm. de diâmetro, e as folhas pinatipartidas ou pinatisectas, com os segmentos estreitos; a segunda apresenta capítulos de 3,5-5,5 cm. de diâmetro, e folhas pinatipartidas, com os segmentos mais largos; a terceira tem os capítulos como os da primeira, mas folhas bipinatisectas e com os segmentos mais estreitos.

Phalacrocarpum oppositifolium (Brot.) Willk. forma **macrocephalum** Willk., Ill. Fl. Hisp. II (1886-1892) 144, t. 175, f. 2.

«II. forma macrocephala folliis late pinnatipartiis». Willk., l. c.

Distingue-se do tipo (forma *commune* Willk.) por ter os capítulos maiores, e os segmentos das folhas mais largos (Est. V). (V. v.).

Floração: Maio-Julho.

Habitat: Solo granítico das regiões montanhosas.

Espécime: Serra da Estrela: Poço do Inferno, 6-5-1943, *J. G. Garcia* 228 A, COI.

Distribuição: Serra da Estrela.

Obs.—A espécie *Phalacrocarpum oppositifolium* (Brot.) Willk. foi originalmente descrita por Brotero (1804) na Flora Lusitanica, sob o binome *Chrysanthemum oppositifolium.* Em 1805, Lagasca, referindo-se à mesma espécie, atribui-lhe o binome *Ch. anomalum.* Poiret (1813) denomina-a *Matricaria anomala,* não aludindo à existência desta composta em Portugal, o que mostra que o autor desconhecia o binome publicado por Brotero. Hoffmansegg e Link (1820), na sua Flore Portugaise, descrevem, sob o binome *Ch. Herminii,* a espécie broteriana, a que fazem referência na sinonímia, dizendo que foram eles que a comunicaram ao nosso naturalista. Sprengel (1826) dá à mesma espécie o binome *Pyrethrum oppositifolium,* utilizando, assim, o epíteto específico broteriano. De Candolle (1837) transfere a espécie lagascana para o género *Leucanthemum* Tourn., não fazendo referência a *Ch. oppositifolium* Brot. Lange (1860-1865) dá à planta a denominação *Pyrethrum anomalum,* e justifica a escolha do epíteto específico da autoria de Lagasca, dizendo: « *Chrysanthemum oppositifolium* Brot., ex descriptione certissime eadem species est, sed nomen Lagascanum antiquius est ideoque conservandum » (1). Esta afirmação de Lange está, porém,

(1) *Vide* LANGE, Pugillus plantarum I-IV (1860-1865) 126.

em desacordo com as datas das publicações de Brotero (1804) e Lagasca (1805) (1). O próprio Lange, em 1870, de colaboração com Willkomm, reconhece a prioridade ao restritivo broteriano, adoptando no Prodromus Floræ Hispanicæ o binome *Phalacrocarpum oppositifolium* (Brot.) Willk., que é, sem dúvida, o nome válido da espécie. Pereira Coutinho (1913), porém, substitui este nome por *Ph. anomalum*, baseando-se, possìvelmente, na frase de Lange que transcrevemos acima, e que, como vimos, não pode ser considerada, para a determinação da prioridade. Sampaio (1913) incorporou, como De Candolle, a espécie em questão no género *Leucanthemum* Tourn., mas dando a prioridade ao epíteto específico da autoria de Brotero.

Phalacrocarpum oppositifolium (Brot.) Willk. in Bot. Zeit. XXII (1864) 252.

Chrysanthemum oppositifolium Brot., Fl. Lusit. I (1804) 381.

Chrysanthemum anomalum Lag., Varied. Cienc. II 4 (1805) 40; Nov. Gen. et Sp. (1816) n. 378.

Matricaria anomala Poir., Encycl. Méth. Bot. Suppl. III (1813) 608.

Chrysanthemum Herminii Hoffgg. et Link, Fl. Port. II (1820) 331, t. 101, ic. plantae, non f. 1, 2 et 3; et t. 102, f. 1, 2 et 3, non ic. plantae (2).

---

(1) Poderia acontecer que o nome dado à espécie por LAGASCA fosse mais antigo que o broteriano *in schedula*, o que não interessa para a determinação da prioridade.

(2) Na elaboração das estampas 101 e 102 da Flore Portugaise de HOFFMANSEGG e LINK, houve uma lamentável troca de figuras, que tem dado lugar a confusões. Assim, a estampa 101, referida a *Chrysanthemum sericeum* Hoffgg. et Link, representa *Ch. Herminii* Hoffgg. et Link = *Ch. oppositifolium* Brot., excepto nos pormenores (figs. 1, 2 e 3), que correspodem, realmente, àquela espécie; e a estampa 102, referida a *Ch. Herminii*, representa *Ch. sericeum*, excepto nos pormenores (figs. 1, 2 e 3), que, de facto, dizem respeito a *Ch. Herminii*. Esta interpretação, dada por JÚLIO HENRIQUES — *vide* Bol. Soc. Broteriana II (1804) 141 —, está de perfeito acordo com o texto da obra de HOFFMANSEGG e LINK. Foi devido a esta troca de figuras que muitos autores indicaram erradamente *Ch. sericeum* Hoffgg. et Link como sinónimo de *Ch. oppositifolium* Brot..

Pyrethrum oppositifolium Spreng., Syst. Veg. III (1826) 585.

Leucanthemum anomalum DC., Prodr. VI (1837) 49.

Pyrethrum anomalum Lange, Pug. pl. I-IV (1860-1865) 125; et in Kjoeb. Vidensk. Meddel. (1861) 75.

Phalacrocarpum anomalum Cout., Fl. Port. (1913) 631.

Leucanthemum oppositifolium Samp., Lista Herb. Port. (1913) 132.

CHRYSANTHEMUM L.

Chrysanthemum pulverulentum (Lag.) Pers.

Quando procedíamos à classificação de material de herbário colhido por nós em 1944, verificámos que tínhamos herborizado esta espécie em uma região não mencionada por Pereira Coutinho (1939). Este autor indica para a planta apenas as regiões de Trás-os-Montes e Beira meridional, quando é certo que ela tem sido também encontrada, como indica Mariz (1891), na Beira trasmontana e central (1).

Em conformidade com esta distribuição da planta, registamos aqui dois novos exemplares. (V. v.).

Espécimes: Vilar Formoso, 10-5-1944, *J. G. Garcia* 371, et *J. G. Garcia* et *F. Murta* s. n., COI; de Valhelhas à Guarda, 5-1933, *Carrisso* e *Mendonça*, COI. 3268.

Distribuição: Trás-os-Montes, Beira Alta e Beira Baixa.

SENECIO L.

Senecio Doronicum L. subsp. lusitanicus Cout.

Pereira Coutinho (1939) indica como duvidosa a existência desta interessante subespécie nos arredores de Buarcos. A interrogação que exprime essa dúvida deve ser

(1) *Vide* Bol. Soc. Broteriana IX (1891) 213.

suprimida, visto que a planta foi aí herborizada em 1880 por M. Ferreira (1), e em 1935 por F. Sousa (2). (V. s.).

Espécimes: Figueira da Foz: Cabo Mondego, 6-1935, *F. Sousa* s. n.

Distribuição: Beira Litoral e Estremadura.

Xeranthemum cylindraceum Sibth. et Sm.

Em 1944, no nosso trabalho Plantas vasculares raras ou novas para a flora portuguesa, demos a notícia de ter sido herborizada nos arredores de Bragança esta interessantíssima espécie, e vimos que Colmeiro (1887) admitiu a possibilidade de Grisley ter encontrado a planta em Portugal (3).

Mais tarde, no decurso das nossas investigações, tivemos o ensejo de ler na Flore Portugaise de Hoffmansegg e Link a diagnose referida a *Xeranthemum inapertum* (L.) Willd., verificando, com surpresa, que a planta descrita era *X. cylindraceum* Sibth. et Sm. O carácter «peranthodium tomentosum» e outros, que aqueles autores indicam no texto, não deixam dúvidas de que se trata, de facto, desta espécie. A causa do erro cometido pelos botânicos alemães tem a sua explicação no facto de eles seguirem a orientação da Flore Française de Lamarck e De Candolle, a que fazem referência, obra onde se nota a mesma incorrecção.

Hoffmansegg e Link indicam para a planta o nome vernáculo *saudades perpétuas*, que Brotero atribuiu a *X. annuum* L.

As localidades que a Flore Portugaise regista para a planta, «Près de *Bragance* le long des chemins entre les

---

(1) *Vide* J. MARIZ in Bol. Soc. Broteriana IX (1891) 230.

(2) Em 1937, o Sr. A. CABRAL colheu, perto do farol do Cabo Mondego, material desta subespécie destinado ao serviço de troca de sementes do Instituto Botânico da Universidade de Coimbra. *Vide* Index Seminum para o ano de 1938, p. 5.

(3) *Vide* J. G. GARCIA in Bol. Soc. Broteriana, sér. 2 XIX (1944) 14. (Nesta página, linha 31, substitua-se *Viridiarium* por *Viridarium*; na pág. 16, linha 5, suprima-se a palavra *non*).

vignes, de même sur la rive droite de la rivière de *Fervença* aux lieux montueux», são aproximadamente as mesmas em que o Rev. BARROS CARNEIRO encontrou *X. cylindraceum* Sibth. et Sm.

Até a data daquela nossa publicação (1944), não encontrámos qualquer referência directa a exemplares de *X. cylindraceum* Sibth. et Sm. colhidos em Portugal.

MARIZ (1892), relativamente a *X. inapertum* (L.) Willd., diz: « é elle frequente nos arredores de Bragança, segundo o testemunho do Conde de Hoffmansegg, mas não tornou a ser encontrado nas localidades citadas por este botanico, por isso o cito com esta auctoridade » (1). Como vemos, trata-se de *X. cylindraceum* Sibth. et Sm. (= *X. inapertum* Lam. et DC., mencionado por HOFFMANSEGG e LINK).

Xeranthemum inapertum (L.) Willd.

Esta espécie é bastante rara no nosso país, sendo apenas conhecida dos arredores de Bragança (*Sampaio* e *P.e A. Carneiro*) e Vimioso (*P.e Miranda Lopes*), o que justifica o facto de só ter sido encontrada depois de MARIZ se referir erradamente a ela (*vide* nota anterior).

PEREIRA COUTINHO (1913 e 1939) indica *X. inapertum* (L.) Willd. para Bragança, sem que tivesse visto exemplares portugueses.

Atendendo a que se trata de uma espécie rara, e dado o facto de PEREIRA COUTINHO (1939) a citar apenas para essa localidade, registamos aqui os exemplares abaixo mencionados. (V. v.).

Espécimes: Bragança, margens da estrada do Sàbor, 30-5-1943, *P.e A. Carneiro* 443, COI.; pr. Vimioso, s. d., *P.e Miranda Lopes* 984, COI. (2).

---

(1) *Vide* J. MARIZ in Bol. Soc. Broteriana X (1892) 197.

(2) *Vide* P.e MIRANDA LOPES in Bol. Soc. Broteriana, sér. 2 V (1928) 251.

RÉSUMÉ

Nous présentons dans ce travail quelques notes concernant:

a) des plantes nouvelles pour la flore portugaise: *Asplenium septentrionale* (L.) Hoffm., espèce de la section *Acropteris*, section aussi nouvelle pour la flore de Portugal; *Poa nemoralis* L., *sensu stricto; Echium plantagineum* L. forma *megalanthum* (LaPeyr.) nob.; *Echium plantagineum* L. forma *cyaneiflorum* nob., f. n.; *Phalacrocarpum oppositifolium* (Brot.) Willk. forma *macrocephalum* Willk.;

b) des plantes qui ne sont pas décrites dans la Flora de Portugal de Pereira Coutinho (1939), mais qui ont été déjà rapportées à la flore portugaise: *Amaranthus hypochondriacus* L.; *Amaranthus patulus* Bert. var. *incurvatus* (Gren. et Godr.) Arcang.; *Vicia villosa* Roth;

c) plusieurs autres plantes dont la répartition en Portugal n'était pas suffisamment déterminée.

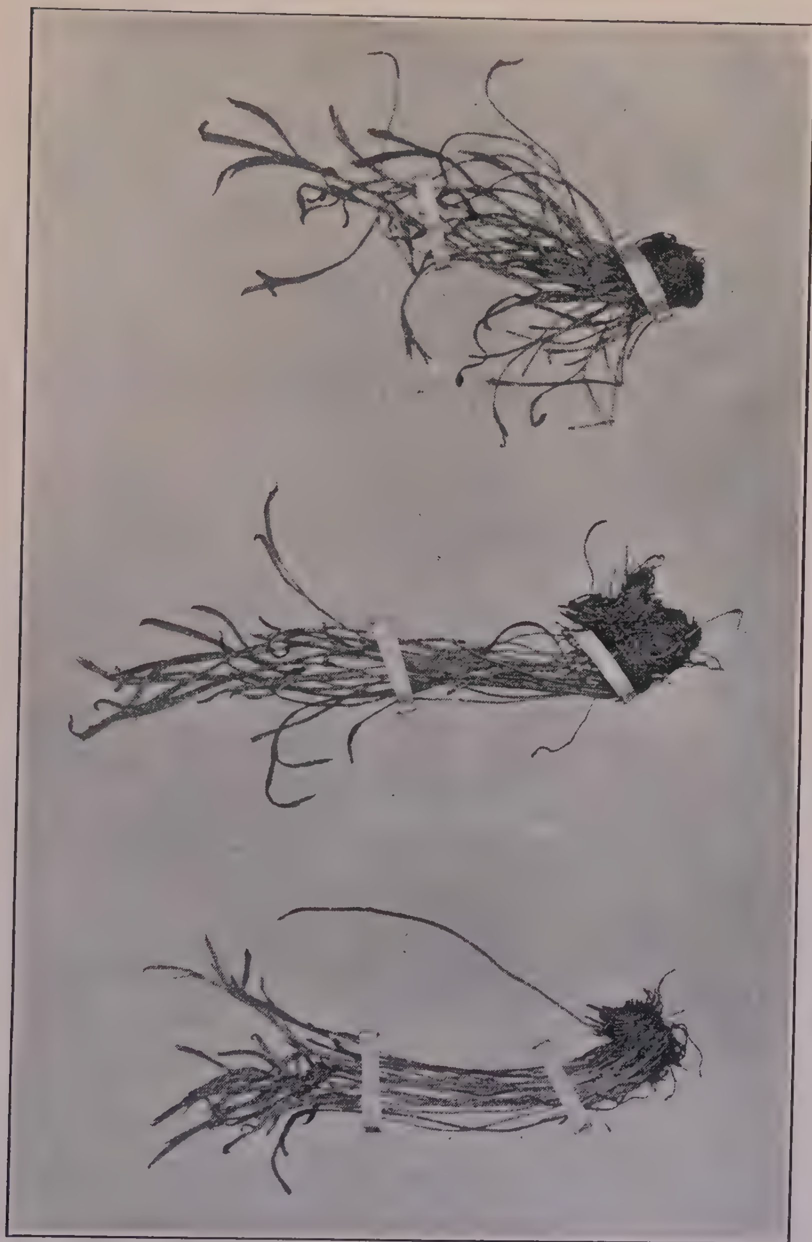
Nous faisons encore quelques considérations à l'égard de la dénomination de certaines plantes dont le nom n'était pas conforme aux Règles internationales de la Nomenclature botanique (1935).

EXPLICAÇÃO DAS ESTAMPAS

ESTAMPA I

Asplenium septentrionale (L.) Hoffm.

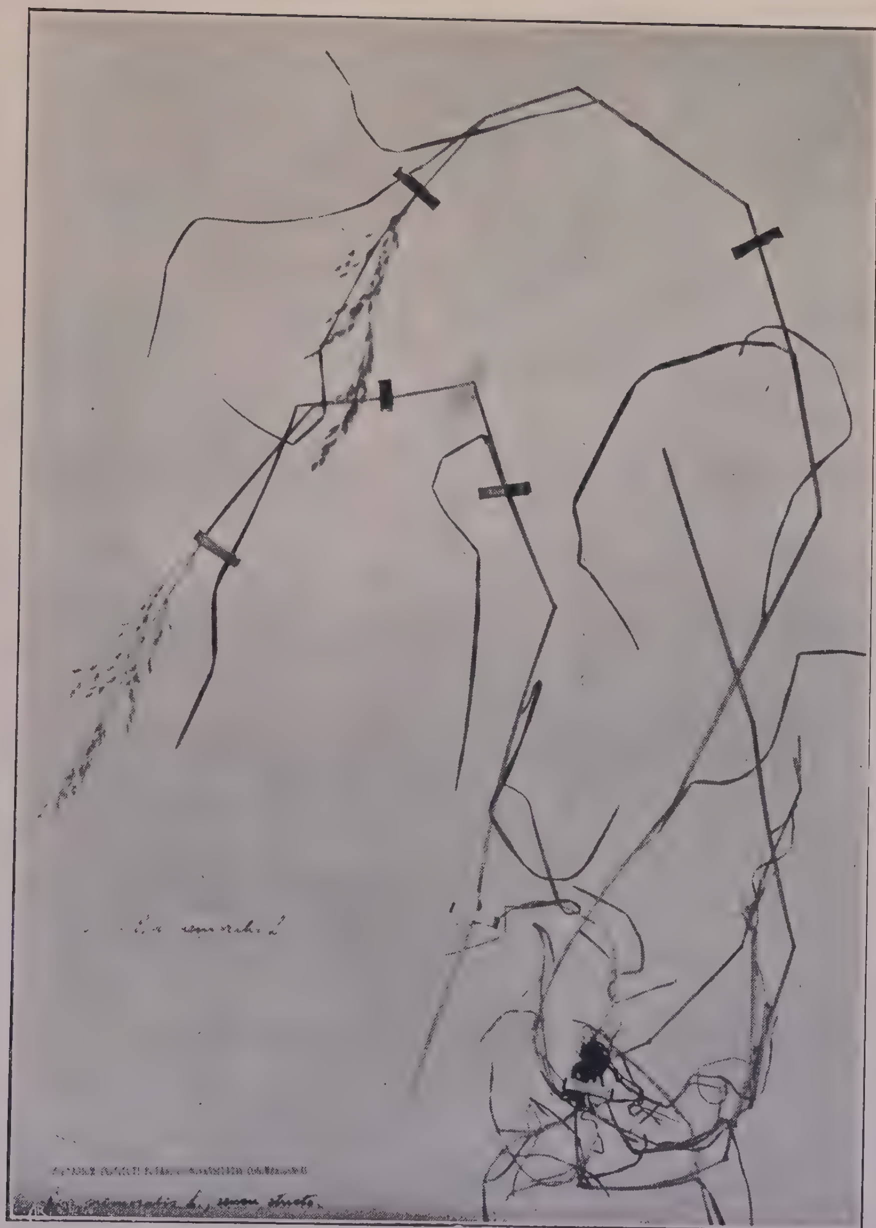
Exemplares do Herbário do Instituto Botânico
da Universidade de Coimbra. × 0,8.



ESTAMPA II

Poa nemoralis L., *sensu stricto*

Exemplar do Herbário do Instituto Botânico
da Universidade de Coimbra. $\times$ 0,4.



ESTAMPA III

Echium plantagineum L. forma **megalanthum** (LaPeyr.) Garcia

Figs. 1 e 2 — Exemplar desta forma albina, dividido em duas partes, no Herbário do Instituto Botânico da Universidade de Coimbra. × 0,22.

Fig. 3 — O mesmo exemplar, na localidade onde foi herborizado, entre uma numerosa população de indivíduos típicos.


1


2


3

ESTAMPA IV

Echium plantagineum L. forma **cyaneiflorum** Garcia

Exemplares do Herbário do Instituto Botânico
da Universidade de Coimbra. ×0,45.



ESTAMPA V

Phalacrocarpum oppositifolium (Brot.) Willk.
forma **macrocephalum** Willk.

Exemplar do Herbário do Instituto Botânico
da Universidade de Coimbra. × 0,4.



SUR LE COMPORTEMENT DES CHROMOSOMES SURNUMÉRAIRES HÉTÉROCHROMATIQUES PENDANT LA MÉIOSE

I. CHROMOSOMES LONGS HÉTÉROBRACHIAUX *

par

A. FERNANDES

Institut Botanique de l'Université de Coimbra

INTRODUCTION

DES chromosomes connus sous les désignations de chromosomes surnuméraires (RANDOLPH, 1928 *a*; FERNANDES, 1939, 1943), chromosomes extra (RANDOLPH, 1928 *b*, 1941), chromosomes additionnels (AVDULOV, 1933; AVDULOV et TITOVA, 1933), chromosomes-fragments surnuméraires (DARLINGTON, 1937), chromosomes-fragments (RHOADES, 1936, 1938; MÜNTZING, 1943, 1944, 1945, 1946) et chromosomes accessoires (HAKANSSON, 1945; MÜNTZING, 1945) ont été trouvés jusqu'à présent chez une quarantaine de Phanérogames (v. DARLINGTON, 1937; DARLINGTON et UPCOTT, 1941; et HAKANSSON, 1945).

Étant donné ce que nous savons au sujet de ces chromosomes, il est probable qu'ils ne représentent pas une seule catégorie en ce qui concerne leur nature, origine et fonction, mais qu'ils correspondent à des types différents. Pour le moment, il semble que nous pourrons établir deux catégories, euchromatique et hétérochromatique, puisque chez quelques plantes — *Paris polyphylla* (DARLINGTON, 1941), et *Godetia nutans* (HAKANSSON, 1945) — ces chromosomes sont euchromatiques, tandis que dans d'autres — *Zea Mays* (RANDOLPH, 1928 *a*, *b*; MCCLINTOCK, 1933; DARLINGTON et UPCOTT, 1941), *Narcissus juncifolius* (FERNANDES, 1939),

* Hommage à M. le Prof. Dr. A. CELESTINO DA COSTA, cytologiste et histologiste éminent et un des plus grands animateurs des recherches cytologiques au Portugal.

Narcissus Bulbocodium (Fernandes, 1943; Fernandes et Serra, 1944), *Sorghum purpureum-sericeum* (Darlington et Thomas, 1941), *Tulipa galatica, Puschkinia libanotica* (La Cour, 1945) et *Nicandra physaloides* (Darlington et Janaki-Ammal, 1945)—on a constaté qu'ils sont hétérochromatiques (1).

L'étude du comportement des chromosomes hétérochromatiques pendant la méiose n'a été faite d'une façon approfondie que chez *Zea Mays*. Ainsi, Randolph (1928 *a, b*) — qui a désigné les chromosomes surnuméraires par le nom de chromosomes B, par opposition aux chromosomes A de la garniture normale — a constaté, sur des préparations obtenues à l'aide du carmin-acétique, que, à la diacinèse et à la métaphase I, ils se colorent plus intensivement que les chromosomes de la garniture normale. Dans les plantes pourvues d'un seul chromosome B, cet élément se comporte, en général, comme univalent, une seule plante ayant été trouvée dans laquelle il prenait part à la formation d'un trivalent. Lorsque le nombre des chromosomes B est supérieur à un, Randolph a constaté que, dans quelques cas, ils restent tous sous la forme d'univalents, tandis que, dans d'autres, ils forment des bivalents, trivalents, etc. Des bivalents et d'autres associations plus élevées, ainsi que des univalents, peuvent exister ensemble. Le comportement des bivalents, des multivalents et des univalents est comparable à celui des mêmes éléments formés par les chromosomes A.

McClintock (1933), tout en soulignant le caractère hétéropycnotique (hétérochromatique) de ces chromosomes, a constaté que, dans les plantes pourvues d'un seul chromosome de ce type, cet élément peut apparaître au pachytène accouplé avec lui-même. Le chromosome se plie, soit vers le milieu, soit vers une autre région, s'accouplant des segments appartenant à la même branche. À ce type spécial d'appariement, entre des segments qui ne sont pas homologues, McClintock a donné le nom d'accouplement

---

(1) Le cas de *Nicandra physaloides* ne nous semble pas suffisamment éclairci (v. aussi HAKANSSON, 1945, p. 9).

non-homologue *(non-homologous pairing)*. D'après l'auteur, ce type d'appariement n'amène pas à la formation de chiasmata, et, pour cette raison, il disparaît le plus souvent au diplotène.

Lorsque le nombre des chromosomes B est supérieur à un, McClintock constate qu'ils peuvent s'apparier les uns avec les autres, soit au moyen d'accouplement homologue, soit au moyen d'un accouplement mixte. Fréquemment, ces associations sont défaites au diplotène et les éléments font leur apparition à la métaphase I comme des univalents. Dans quelques cas, cependant, les associations persistent jusqu'à la métaphase I.

En poursuivant l'analyse du comportement méiotique des chromosomes B de *Zea Mays*, Darlington et Upcott (1941) sont amenés à conclure que ces chromosomes sont hétérochromatiques, que leur fréquence de «crossing-over» est proportionnellement moindre, relativement à leur longueur, que celle des chromosomes A, et que la distribution du «crossing-over» est aussi différente de celle des chromosomes normaux. Ces auteurs ont constaté de plus que la fréquence de «crossing-over» de ces chromosomes est augmentée par la présence de nombres impairs, et qu'ils sont plus susceptibles que les chromosomes normaux de subir des irrégularités pendant la mitose (défaut des centromères) et à être perdus au cours de la méiose. Les chromosomes B sont aussi particulièrement susceptibles de subir des délections, en donnant origine à des chromosomes plus courts (chromosomes b).

Les travaux mentionnés montrent donc que les chromosomes surnuméraires hétérochromatiques présentent des particularités méiotiques spéciales, par suite desquelles ils diffèrent des chromosomes euchromatiques. Convaincus de ce que beaucoup de choses nous restent encore à apprendre en ce qui concerne l'origine, la fonction et le comportement mitotique et méiotique des chromosomes surnuméraires hétérochromatiques, nous avons entrepris des recherches chez *Narcissus Bulbocodium* dans le but de contribuer à l'éclaircissement de ces questions. Quelques-uns des résultats obtenus ont été déjà publiés sous une forme prélimi-

naire (Fernandes, 1943). Avec la publication du présent travail, consacré exclusivement à l'étude de la conduite des chromosomes surnuméraires hétérochromatiques longs hétérobrachiaux au cours de la méiose, nous commençons à présenter, d'une façon détaillée, les résultats des recherches poursuivies sur ce sujet pendant ces dernières années. La deuxième partie de ces recherches sera consacrée aux chromosomes courts isobrachiaux ou presque.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE

Nos recherches ont porté sur des plantes de *Narcissus Bulbocodium* L. qui portent dans nos cultures les désignations suivantes: 358, Ind. 3 et S. 7, Ind. L. Dans le but de rendre les références plus faciles, nous désignons ces mêmes plantes par les lettres A et B dans l'exposition qui va suivre.

La première plante a été trouvée au Jardin Botanique, parmi les descendants d'une autre récoltée à Valongo (environs de Porto). La deuxième a été obtenue dans nos cultures, au moyen du croisement d'une plante à 3 chromosomes surnuméraires, provenant de l'état spontané (Valongo), avec une autre diploïde normale, recueillie à Vale da Azenha (environs de Coimbra).

Comme matériel, nous avons employé des méristèmes radiculaires et des anthères avec les cellules-mères des grains de pollen à l'état convenable.

Les méristèmes radiculaires ont été fixés au liquide de Navachine (modification de Bruun) et les coupes transversales, d'une épaisseur de 18 μ, ont été colorées au violet de gentiane.

Les préparations des anthères ont été effectuées par l'emploi des deux techniques suivantes:

a) Fixation aux liquides de Navachine (modification de Bruun), La Cour 2 BE et Flemming-Benda, et coloration au violet de gentiane;

b) Dissociation d'anthères, préalablement fixées à l'alcool-acétique (3:1), dans une goutte de carmin-acétique, et montage définitif au baume du Canada, par l'emploi de de la technique relatée par La Cour (1937).

La fixation aux liquides de La Cour 2 BE et Flemming-Benda ne nous a pas fourni de bons résultats. La fixation au Navachine s'est montré plus adéquate. Cependant, la technique des frottis au carmin-acétique nous a donné des résultats bien supérieurs à ceux fournis par la méthode de l'inclusion.

OBSERVATIONS

1. — PLANTE A

Dans les méristèmes radiculaires de cette plante, nous avons trouvé 15 chromosomes, dont 14 correspondaient exactement aux éléments de la garniture normale (fig. text. 1 *a*), représentée par la formule suivante (FERNANDES, 1934, 1936):

$$2n = 14 = 2\ Lp_1 + 2\ Lp_2 + 2\ Lp_3 + 2\ lm + 4\ PP + 2\ Pp'$$

Le chromosome surnuméraire (fig. text. 1*b*) ressemble considérablement au type Lp_1.

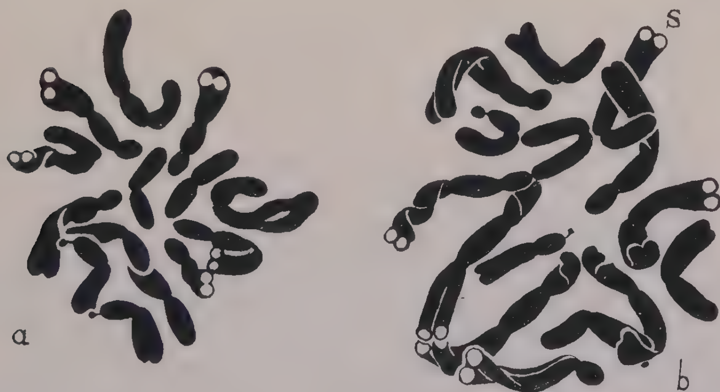


Fig. 1. — *Narcissus Bulbocodium* L. *a*, Plaque équatoriale dans une cellule du méristème radiculaire d'une plante normale. *b*, Idem dans la plante à chromosome surnuméraire (S). × 3.450.

La nature hétérochromatique de ce chromosome a été mise en évidence par son comportement pendant la mitose. En effet, ce comportement est semblable à celui d'un autre

chromosome surnuméraire trouvé chez *N. juncifolius* (v. Fernandes, 1939). De cette façon, le chromosome ne subit pas une désintégration télophasique complète, et les noyaux interphasiques montrent un chromocentre (fig. 1, Pl. I) qui, dans quelques cas, correspond à presque tout le chromosome non désintégré, et, dans d'autres, à une région plus ou moins longue de l'extrémité distale aussi non désintégrée. Comme chez *N. juncifolius*, le chromocentre montre la réaction nucléaire de Feulgen d'une façon assez nette.

Au pachytène, il n'est pas possible de discerner le chromosome surnuméraire sur la plupart des figures (figs. 2 et 3, Pl. I). Par contre, l'hétérochromatine du satellite et de la région de la branche du chromosome satellitifère attachée au nucléole se montre assez nettement, par le fait qu'elle est toujours compacte (figs. 2 et 3, Pl. I). Cependant, sur quelques figures, nous avons réussi à observer le chromosome surnuméraire, dont la compacité n'est pas toujours la même, tous les degrés de transition existant entre les cas où il est seulement un peu plus compact que les chromosomes euchromatiques (figs. 4 et 5, Pl. I) et ceux dans lesquels il présente une compacité comparable à celle de l'hétérochromatine du chromosome satellitifère (figs. 6 et 7, Pl. I). Ces variations doivent probablement être attribuées aux différents degrés de désintégration, subis par ce chromosome pendant la télophase de la division pré-méiotique (v. Fernandes, 1939).

Dans quelques figures (fig. text. 2*b*, et fig. 4, Pl. I), nous avons constaté que, à ce stade, le chromosome surnuméraire se présentait clivé longitudinalement, c'est-à-dire constitué par deux chromatides. De cette façon, ce chromosome montre précocité par rapport aux chromosomes normaux, en présentant au pachytène une structure que les autres chromosomes acquisent seulement au diplotène. Une telle précocité a été aussi observée par Powers et Dahl (1937) dans un chromosome B de *Zea Mays*.

Parmi les figures de pachytène où nous avons identifié le chromosome surnuméraire (figs. 4-7, Pl. I), nous n'en avons trouvé aucune nous montrant ce chromosome accouplé avec quelque autre de la garniture normale.

Par contre, nous avons constaté qu'il s'accouple avec lui--même, d'une façon semblable à celle décrite par McCLINTOCK (1933) pour les chromosomes B de *Zea Mays*. Le chromosome se plie par un certain point, et les deux segments s'accouplent l'un avec l'autre. Le point où le pliement a lieu est variable selon les cas, correspondant, quelquefois, au milieu du chromosome (fig. 7, Pl. I). Quelquefois, cependant, ce point se trouve localisé vers le milieu de la branche longue, ou à une distance plus ou moins considérable de ce point (figs. text. 2 *a*, *b*, et figs. 4 et 5, Pl. I).

L'étude détaillée de ce chromosome au pachytène, bien que très difficile à faire par le fait que les chromomères ne se distinguent pas d'une façon assez nette, nous a permis de constater qu'il n'y avait pas de correspondance entre les chromomères des segments appariés (fig. text. 2*a*).



Fig. 2. — *a* et *b*, Chromosomes surnuméraires au pachytène, montrant le pliement et l'accouplement des deux segments de la branche longue. Remarquer la précocité montrée par le chromosome représenté par la fig. *b*. × 3.450.

Ce fait est quelquefois montré avec plus de netteté dans la région où l'appariement se termine, puisque, dans cette région, les volumineux chromomères de l'extrémité distale de la branche longue se trouvent accouplés avec d'autres plus petits, appartenant au segment voisin du centromère (fig. 5, Pl. I).

Ces observations et le fait que le point où le pliement a lieu n'est pas fixe montrent, en toute évidence, que l'appariement qui a lieu dans ce chromosome est non--homologue, comme chez *Zea Mays*.

Sur certaines figures, il nous a semblé que les deux segments accouplés se trouvaient disposés parallèlement. Dans d'autres cas, cependant, nous avons pu constater que les deux segments se trouvaient enroulés l'un dans l'autre (figs. text. 2 *a*, *b*, et fig. 4, Pl. I) et nous croyons que cette condition arrive toujours.

Malheureusement, nous n'avons pas réussi à trouver, dans notre matériel, des diplotènes et des diacinèses, ce qui nous a empêché de suivre le chromosome surnuméraire pendant ces stades.

Les métaphases I (figs. 8-11, Pl. I et fig. 1, Pl. II) nous ont montré 7 bivalents et le chromosome surnuméraire. Parmi les 338 figures examinées, nous n'en avons trouvé qu'une seule (0, 29 %) montrant l'élément surnuméraire sous la forme d'un univalent typique, c'est-à-dire non accouplé avec lui-même (fig. text. 3 *a*). Dans toutes les autres, nous avons constaté que ce chromosome était accouplé avec lui-même (figs. text. 3 *b*-*h*, figs. 8-11, Pl. I et figs. 1-4, Pl. II) et qu'il ne s'apparie avec aucun autre élément de la garniture pour former des bivalents ou des trivalents. Le chromosome, d'une longueur variant entre 4,2 et 5,3 μ, prend alors le plus souvent la forme d'un corps presque cylindrique pourvu d'un bec plus ou moins long, qui correspond à la région où le chromosome ne possède pas une épaisseur comparable à celle des bivalents (figs. text. 3 *b*-*e*, figs. 9, 11, Pl. I et 2 et 3, Pl. II). Quelquefois, le bec n'est pas visible et le chromosome présente l'aspect d'un fer à cheval avec les deux branches très rapprochées (fig. 8, Pl. I, et fig. 1, Pl. II). Moins fréquemment, l'élément surnuméraire peut se présenter sous la forme d'un anneau, engendré



Fig. 3. — Différents aspects du chromosome surnuméraire à la métaphase I. *a*, Non-apparié avec lui-même. *b*-*e*, Formes pourvues d'un bec, qui correspond à la région simple du chromosome. *f*-*h*, Formes en anneau. $\times$ 1.800.

par l'attachement des deux extrémités (figs. text. 3 *f-h*, et fig. 4, Pl. II).

Les formes à bec révèlent que le pliement a eu lieu vers le milieu de la branche longue, et la variation de la longueur du bec montre que le point du pliement est un peu variable. Les formes en fer à cheval et en anneau, où aucun bec n'est visible, correspondent, probablement, aux cas où le pliement a eu lieu vers le milieu du chromosome. Les observations effectuées à la métaphase I s'accordent donc avec les faits mis en évidence par l'étude du pachytène.

Le chromosome surnuméraire se présente en général assez compact et, par ce fait, sa structure ne peut pas se mettre en évidence d'une façon assez nette. Cependant, dans quelques cas, nous avons pu constater que la région où le chromosome possède une épaisseur de bivalent pré-

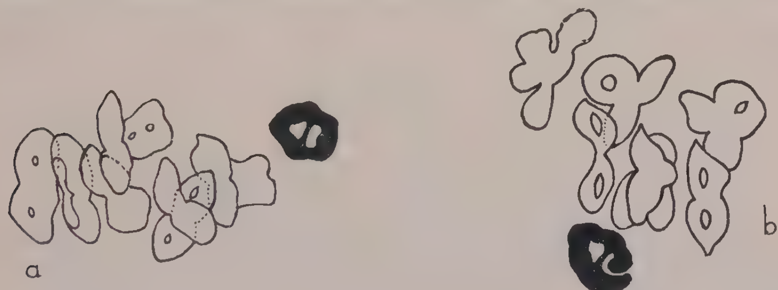


Fig. 4. — *a* et *b*, Métaphases I montrant le chromosome surnuméraire localisé, respectivement, au voisinage du plan équatorial et hors de ce plan. Remarquer les formations ayant l'aspect de chiasmata. × 1.800.

sente une structure quadruple, puisqu'elle se compose de deux moitiés, dont chacune est constituée par un segment plié et enroulé sur lui-même. Une observation soigneuse a montré de plus des formations ayant l'aspect de chiasmata (1 ou 2) reliant les deux moitiés appariées (figs.text. 4*a*, *b*).

Bien qu'il possède une structure de bivalent (tout au moins en partie), le chromosome surnuméraire se comporte comme univalent en ce qui concerne son orientation dans le fuseau, par le fait qu'il ne posséde qu'un seul centromère. De cette façon, il peut se trouver soit dans le plan

équatorial (fig. text. 5, et fig. 2, Pl. II), soit dans le voisinage d'un des pôles (fig. 11, Pl. I, et figs. 1 et 4, Pl. II), soit dans la région comprise entre le plan équatorial et un des pôles (figs. 8-10, Pl. I). La localisation hors du plan équatorial est la plus fréquente, puisque l'analyse de 338 figures nous a montré 281 cas (83,1 %) de ce type et 57 (16,9 %) dans lesquels le chromosome se trouvait dans le plan équatorial.

Le chromosome surnuméraire non-accouplé avec lui-même peut se disposer dans le plan équatorial et son centromère peut se diviser. Les deux chromatides émigrent vers les pôles, et ils peuvent être ou n'être pas inclus dans les groupes polaires. Étant donné la rareté des cas dans lesquels le chromosome ne s'accouple pas avec lui-même, nous ne sommes pas étonnés du fait que nous n'avons trouvé qu'une seule figure montrant la séparation de deux chromatides correspondant à un chromosome typiquement univalent (fig. 5, Pl. II). L'analyse soigneuse des deux

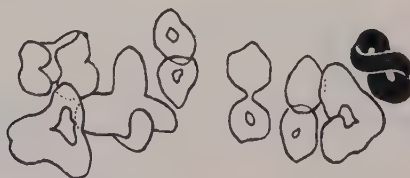


Fig. 5. — Métaphase I montrant le chromosome surnuméraire dans le plan équatorial. × 1.800.

chromatides nous a montré que ceux-ci présentaient une fente longitudinale assez nettement visible (voir particulièrement la région indiquée par la flèche dans la fig. 5, Pl. II). Cette observation montre donc que, comme chez *N. juncifolius* (v. Fernandes, 1939, p. 161), les chromosomes hétérochromatiques de *N. Bulbocodium* sont longitudinalement doubles à l'anaphase. De cette façon, la fissuration longitudinale pour la division suivante a lieu pendant les derniers stades de la prophase ou pendant la métaphase (peut-être au moment de la division des cen-

tromères) de la division antérieure, et non pendant l'interphase, comme quelques auteurs l'ont prétendu (pour les références bibliographiques v. FERNANDES, *l. c.*).

Lorsque le chromosome surnuméraire s'accouple avec lui-même et il est inclus dans le fuseau, ce chromosome peut se disposer dans le plan équatorial après la disjonction des bivalents (figs. text. 6*a-c*). Le centromère se clive, et les chromatides se séparent et émigrent vers les pôles. Nous avons observé 40 figures, correspondant à la disjonction du chromosome accouplé avec lui-même, et les types suivants de séparation ont été trouvés:

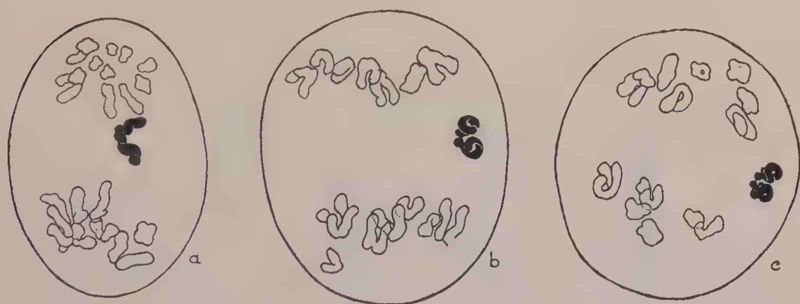


Fig. 6. — *a-c*, Le chromosome surnuméraire se place dans le plan équatorial après la disjonction des bivalents. Dans la fig. *a*, le centromère ne s'est pas encore probablement divisé, mais l'enroulement des deux segments de chacun des chromatides est en train de se défaire. Dans les figs. *b* et *c*, les centromères se sont déjà clivés et les chromatides sont sur le point de se séparer complètement ; remarquer les liaisons et l'enroulement. × 900.

1. *Séparation de deux chromatides égaux.* — Ce type de disjonction est le plus fréquent, puisqu'il a été observé dans 33 cas (82,5 %). Les deux moitiés du chromosome surnuméraire se repoussent et on peut quelquefois voir entre elles des liaisons semblabes à des chiasmata sur le point de se défaire (figs. 6 et 7, Pl. II). Le centromère se clive (figs. text. 6*b, c*), après quoi les deux moitiés commencent à se séparer vers les pôles (fig. text. 7, et figs. 8 et 9, Pl. II). Pendant la migration, la structure de ces moitiés devient assez nette, et on peut constater qu'elles sont constituées,

chacune, par un chromatide long plié sur lui-même, avec les deux segments enroulés l'un dans l'autre (figs. text. 6*b*, *c*, 7, et figs. 9-11, Pl. II). Sur quelques figures, nous avons vérifié que les deux segments enroulés étaient inégaux (figs. text. 6*b*, *c*, 7, et fig. 9, Pl. II), le plus court correspondant à celui qui ne possède pas le centromère. Sur d'autres figures, cependant, nous avons pu constater que les deux segments possédaient la même longueur (fig.

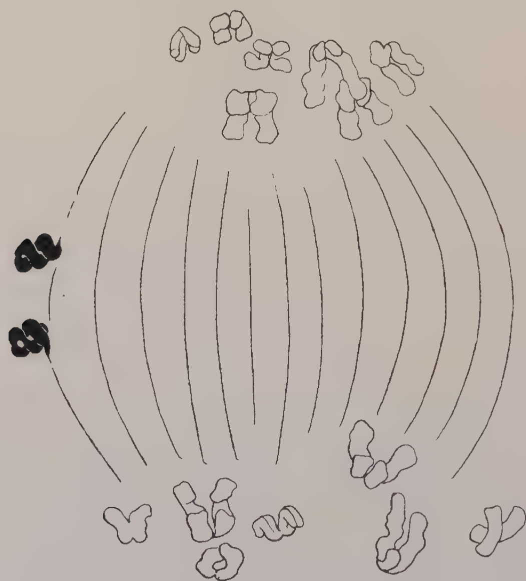


Fig. 7. — Anaphase I. Les deux chromatides (en noir, à gauche) du chromosome surnuméraire viennent de se séparer. Remarquer l'enroulement. Confronter avec la fig. 9, Pl. II. $\times$ 1.450.

text. 8, et figs. 10 et 11, Pl. II). Les premières images correspondent aux cas où le pliement intéresse seulement la branche longue et les autres à ceux où le pliement a lieu vers le milieu du chromosome.

La comparaison des deux chromatides montre que, dans tous les cas, les spirales des segments possèdent la même direction d'enroulement (figs. text. 6*a-c*, 7, et figs. 9-11, Pl. II).

Au fur et à mesure que les chromatides s'écartent vers les pôles, les segments se déroulent progressivement, et les chromatides présentent un aspect hélicoïde (figs. 1-6, Pl. III). La continuation de ce processus mène le plus souvent à un déroulement complet, et les chromatides se présentent alors distendus, avec une longueur relativement considérable (fig. 7, Pl. III). Quelquefois, cependant, l'enroulement ne se défait pas complètement dans les deux chromatides avant leur inclusion dans les groupes polaires.



Fig. 8. — Anaphase I. L'enroulement du chromatide qui émigre vers le pôle supérieur de la figure montre que le pliement a eu lieu vers le milieu du chromosome. × 1.800.

Dans quelques cas, le déroulement ne marche pas avec la même vitesse dans les deux chromatides-fils, et il peut arriver qu'un des chromatides soit complètement déroulé, tandis que l'autre continue à se montrer partiellement hélicoïde (fig. 7, Pl. III).

Les chromatides peuvent gagner les pôles respectifs et être inclus dans les noyaux-fils (1,29 % des cas). Dans ces cas, ils ne subissent pas de transformations télophasiques complètes et ils persistent dans un état plus ou moins compact (fig. 8, Pl. III), ce qui montre leur nature hété-

rochromatique. Cependant, quelquefois les deux chromatides ne réussissent pas à gagner les pôles avant le début de la télophase. Dans ces cas, ils demeurent dans le cytoplasme, où ils subissent la désintégration télophasique, en terminant par se convertir en micronoyaux (22 % des cas). Ces micronoyaux présentent une structure variable, le plus souvent comparable à celle des noyaux principaux (fig. 9,

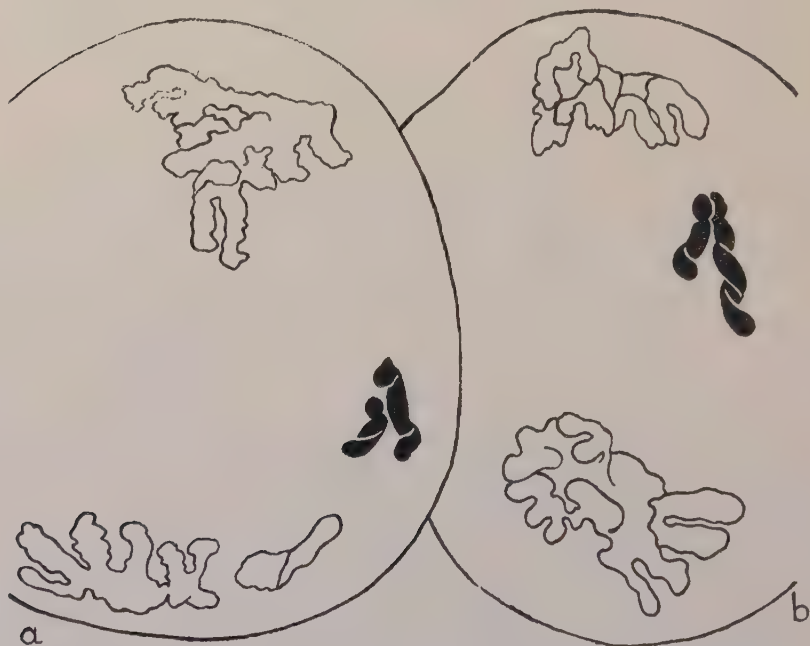


Fig. 9. — *a* et *b*, Séparation de deux chromatides inégaux. × 1.800.

Pl. III et figs. 1 et 2, Pl. IV). Quelquefois, cependant, ils se montrent un peu plus compacts (fig. 3, Pl. IV), mais le degré de compacité est toujours moindre que celui des chromosomes inclus dans les noyaux principaux. Dans quelques micronoyaux, nous avons constaté la présence d'une goutte nucléolaire. DARLINGTON et LA COUR (1945) ont vérifié que, chez *Trillium* et *Vicia*, les chromosomes hétérochromatiques rejetés dans le cytoplasme ne subissent pas de transformations télophasiques, persistant très com-

pacts. Les chromosomes hétérochromatiques de la plante A de *N. Bulbocodium* se comportent donc d'une façon différente.

Dans d'autres cas (7, 8 %), finalement, un des chromatides est inclus dans un des groupes polaires, tandis que l'autre demeure dans le cytoplasme, où il devient un micronoyau.

2. *Séparation de deux chromatides inégaux.* — Parmi les 40 figures étudiées, nous avons trouvé 3 cas (7,5 %) montrant disjonction de chromatides inégaux, un long et un autre possédant à peu près la moitié de la longueur du premier. Nous figurons deux de ces cas (fig. text. 9 *a*, *b*, et



Fig. 10. — Disjonction de deux chromatides égaux ou presque, et d'un fragment relativement long. × 1.200.

figs. 4 et 5, Pl. IV). Comme les chromatides normaux, ils se séparent et émigrent vers les pôles, et ils peuvent être inclus dans les groupes polaires (fig. 6, Pl. IV), ou être rejetés dans le cytoplasme, où ils sont convertis en micronoyaux, qui sont alors inégaux.

3. *Séparation de deux chromatides égaux ou presque, et d'un fragment relativement long.*—Nous avons trouvé un seul cas (2,5 %) de ce type, représenté dans la fig. text. 10.

4. *Séparation d'un pont assez long et d'un fragment très court.*—Un seul cas (fig. 7, Pl. IV) a été trouvé (2,5 %).

5. *Formation d'un pont long et d'un fragment à taille moyenne.* — Un seul cas (2,5 %) a été aussi trouvé (fig. text. 11).

6. *Formation d'un pont très court, accompagné d'un fragment long en U et d'un autre très court.* — Nous n'avons trouvé qu'un seul cas (2,5 %), représenté dans la fig. text. 12 et figs. 8 et 9, Pl. IV.



Fig. 11. — Début de la télophase. Formation d'un pont long et d'un fragment à taille moyenne. ×2.200.

7. *Séparation de deux chromatides inégaux et d'un anneau.* — Ce type de disjonction a été inféré de l'apparition d'une figure qui montrait le chromosome surnuméraire au voisinage d'un des pôles, et constitué par deux parties: un anneau et une formation plus longue, que nous considérons comme deux chromatides encore reliés par le centromère (fig. 1, Pl. V).

Le chromosome surnuméraire, localisé dans le plan équatorial de la cellule ou dans son voisinage, peut n'être pas inclus dans le fuseau. Deux cas pourront alors avoir lieu: 1) Le chromosome engendre un fuseau, qui se soude avec le fuseau principal (fig. text. 13, et figs. 2 et 3, Pl. V); 2) Le chromosome engendre un fuseau, qui persiste indépendant du fuseau principal (fig. text. 14, et fig. 4, Pl. V). Dans le pre-

mier cas, qui est le plus fréquent, le chromosome se comporte comme dans le cas où il est inclus dans le fuseau

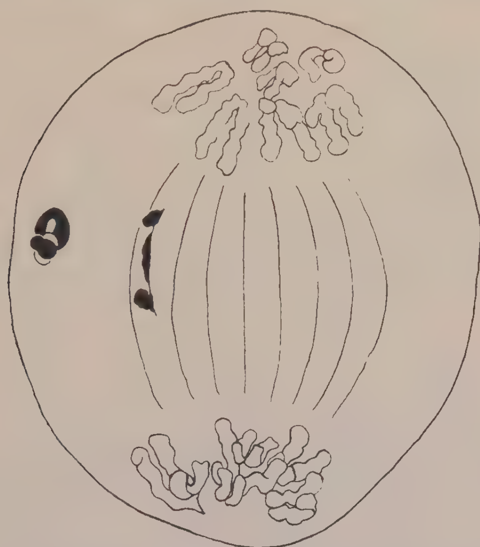


Fig. 12. — Formation d'un pont très court et de deux fragments: un long en U et un autre très court. Confronter avec les figs. 8 et 9, Pl. IV. × 1.450.

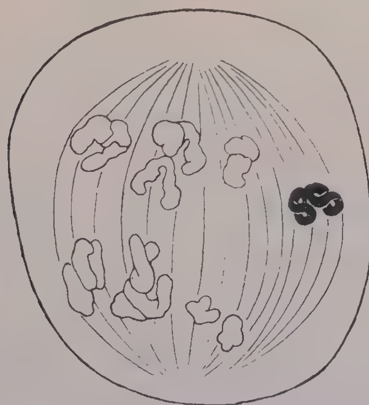


Fig. 13. — Anaphase I. Le chromosome surnuméraire a engendré un fuseau, qui s'est soudé avec le fuseau principal. × 1.200.

principal (fig. text. 13, et figs. 2 et 3, Pl. V). Dans le deuxième, le centromère se divise et les chromatides émigrent

vers les pôles, où ils deviennent des micronoyaux (fig. 5, Pl. V). Pendant l'émigration polaire, ont lieu les mêmes phénomènes de déroulement des deux segments, qui ont été décrits à propos du cas où le chromosome subit l'influence du fuseau principal.

Lorsque le chromosome surnuméraire se trouve localisé dans la région comprise entre le plan équatorial et un des pôles, ou au voisinage d'un des pôles, il peut demeurer inclus dans le fuseau principal. Pendant l'anaphase, le chromosome subit des modifications (figs. 6-11, Pl. V), qui se traduisent par l'écartement des deux chromatides, qui se montrent quel-



Fig. 14. — Début de la télophase I. Le chromosome surnuméraire a engendré un fuseau indépendant, parallèle au fuseau principal. × 1.200.

quefois, aux premiers stades, reliés par des liaisons simulant des chiasmata (figs. 6 et 7, Pl. V) sur le point de se défaire. L'écartement s'accentue, les liaisons disparaissent et le chromosome assume la forme d'un fer à cheval (figs. 6 et 7, Pl. V) et plus tard celle d'un V, qui va s'ouvrant progressivement (figs. 8-10, Pl. V). Cependant, les chromatides demeurent reliés par le centromère, qui ne se clive pas. La constitution présentée par chacun des chromatides est semblable à celle décrite pour les cas dans lesquels le chromosome se divise sous l'action du fuseau, c'est-à-dire deux segments, soit égaux, soit inégaux, enroulés l'un dans

l'autre (fig. text. 15, et fig. 10, Pl. V). La direction de cet enroulement est aussi la même sur les deux chromatides-fils. Au fur et à mesure que l'anaphase avance, les segments peuvent se dérouler, mais le déroulement n'est pas



Fig. 15. — Moitié d'une anaphase montrant la structure du chromosome surnuméraire (en noir), lorsqu'il est inclus dans un des groupes polaires. Confronter avec la fig. 1, Pl. VI. × 2.200.



Fig. 16. — *a* et *b*, Fuseaux tripolaires. Le chromosome surnuméraire est sur le point de se séparer complètement en deux chromatides dans le fuseau plus petit. × 1.200.

aussi intense que dans le cas où le chromosome se clive dans le plan équatorial, et il n'est jamais rendu complet (figs. 1 et 2, Pl. VI). À la télophase (fig. 11, Pl. V), le

chromosome, inclus dans un des groupes polaires (58,7 % des cas), commence à subir la désintégration télophasique, mais nous devons supposer que cette désintégration est suspendue lorsque la membrane nucléaire se forme, puisque, dans les noyaux interphasiques, le chromosome surnuméraire se présente beaucoup plus compact que les chromosomes normaux (fig. 3, Pl. VI).

Il pourra aussi arriver que le chromosome surnuméraire ne soit pas inclus dans le fuseau principal. Il peut former alors un fuseau (figs. text. 16 *a*, *b*, et figs. 4 et 5, Pl. VI) dont un des pôles est celui du fuseau principal et l'autre un pôle indépendant (fuseau tripolaire). Le chromosome peut se cliver, et un des chromatides pourra être inclus dans un des noyaux-fils, tandis que l'autre engendrera un micronoyau dans l'autre pôle.

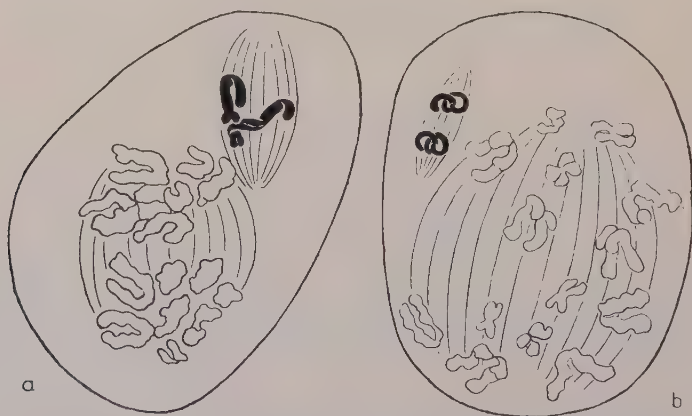


Fig. 17. — *a* et *b*, Division du chromosome surnuméraire dans un fuseau accessoire. Confronter la fig. *a* avec la fig. 6, Pl. VI et la fig. *b* avec les figs. 7 et 8, Pl. VI. *a*, × 1.200. *b*, × 1.450.

Quelquefois, le chromosome peut engendrer un fuseau indépendant au voisinage d'un des pôles et se cliver en deux chromatides (figs. text. 17 *a*, *b*, et figs. 6-8, Pl. VI).

Lorsque le chromosome se situe au delà d'un des pôles du fuseau principal, un autre fuseau peut apparaître entre ce pôle et un autre situé près de la membrane cellulaire.

Le chromosome peut se diviser dans ce fuseau (fig. text. 18, et fig. 9, Pl. VI), et un des chromatides peut être inclus dans le groupe polaire, tandis que l'autre émigrera vers l'autre pôle, où il deviendra un micronoyau.

Dans quelques cas, le chromosome surnuméraire ne se clive pas, et il n'est inclus dans aucun des groupes polaires (10,38 %). Il subit tout d'abord le déroulement caractéristique de l'anaphase, et plus tard la désintégration

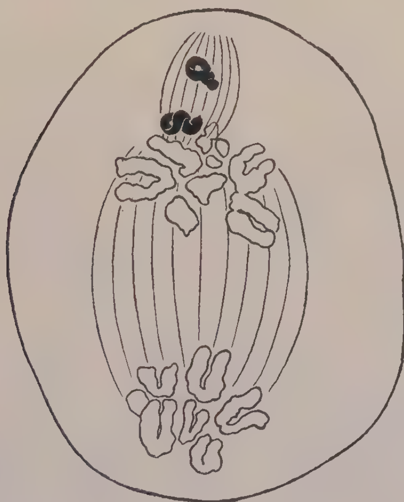


Fig. 18. — Le chromosome surnuméraire, localisé au delà du pôle supérieur (dans la figure), a engendré un fuseau dont un des pôles appartient au fuseau principal et l'autre se situe au voisinage de la membrane cellulaire. Le chromosome s'est clivé en deux chromatides, dont un marche vers le pôle du fuseau principal et l'autre vers l'autre pôle. Confronter avec la fig. 9, Pl. VI. × 1.200.

télophasique, qui mène à la formation d'un micronoyau, ayant une structure à peu près comparable à celle des noyaux principaux (figs. 10-12, Pl. VI).

Par le fait que la fixation au Flemming-Benda n'a pas réussi, nous n'avons pu effectuer l'étude de la deuxième division. Le chromosome surnuméraire doit, cependant; se comporter comme univalent. De cette façon, plusieurs cas pourront avoir lieu :

a) Le chromosome, clivé longitudinalement à l'exception du centromère et inclus dans un des noyaux-fils (58,7 % des cas), se mettra en plaque à la métaphase II. Le centromère se clivera et les deux chromatides émigreront régulièrement vers les pôles respectifs. Des tétrades possédant deux noyaux pourvus de chromosome surnuméraire et les deux autres dépourvus seront alors engendrées (fig. text. 19 *a*);

b) Lorsque le chromosome se clive à l'anaphase I et les deux chromatides sont inclus dans les noyaux respectifs,

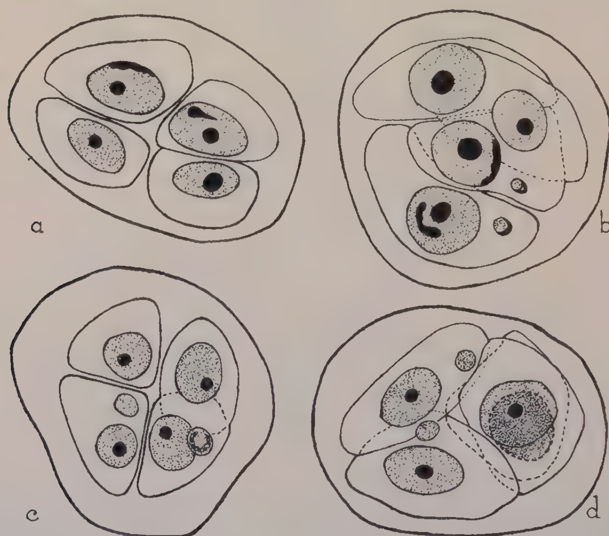


Fig. 19. — Les trois types de tétrades identifiés. Explication dans le texte. × 1.200.

trois cas pourront avoir lieu: 1) les chromosomes ne se cliveront pas à l'anaphase II, et ils se comporteront comme des retardataires, qui peuvent être inclus dans les groupes polaires, ou demeurer dans le cytoplasme où ils deviendront des micronoyaux; 2) les deux chromosomes se cliveront à l'anaphase II, et les chromatides seront inclus dans les noyaux respectifs; 3) un des chromosomes se clivera, tandis que l'autre, ne se clivant pas, se comportera comme retardataire;

c) Lorsque le chromosome tout entier engendre un

micronoyau à la télophase I, ce micronoyau pourra donner naissance à une plaque accessoire, pourvue d'un fuseau qui pourra se souder ou non avec le fuseau de la plaque des chromosomes normaux. Dans le premier cas, le chromosome se comportera comme dans le cas *a)*; dans le deuxième, il se clivera, en donnant naissance à deux micronoyaux ;

d) Lorsque le chromosome engendre deux micronoyaux à la télophase I, ceux-ci pourront peut-être engendrer des métaphases II. Les fuseaux de celles-ci pourront se fusionner avec les fuseaux principaux, ou rester indépendants. Dans le premier cas, les chromosomes se comporteront comme dans le cas *b)*. Dans le deuxième, ils engendreront un ou deux micronoyaux.

Bien que, par le fait que la fixation n'a pas été adéquate, nous n'ayons pas effectué une étude détaillée, les types de tétrades suivants ont été trouvés : *a)* à deux noyaux pourvus de chromosome surnuméraire (fig. text. 19*a*); *b)* quatre noyaux normaux et deux micronoyaux (figs. text. 19*c* et *d*) ; *c)* à deux noyaux pourvus de chromosome surnuméraire, deux noyaux normaux et deux micronoyaux (fig. text. 19*b*). L'apparition de ce dernier type de tétrade montre que le chromosome surnuméraire peut se diviser deux fois de suite, c'est-à-dire pendant la division hétérotypique et la division homéotypique. Il faudra donc s'attendre à des tétrades à quatre noyaux pourvus de chromosome surnuméraire, bien que nous ne les ayons pas rencontrées.

Les micronoyaux présentent une structure soit comparable à celle des noyaux principaux, soit un peu plus compacte, mais les chromosomes surnuméraires inclus dans les noyaux se montrent toujours plus compacts.

2. — PLANTE B

Nous n'avons pas réussi à obtenir des méristèmes radiculaires de cette plante, ce qui nous a empêché d'étudier les chromosomes somatiques. D'après ce que nous avons observé à l'anaphase de la division hétérotypique,

le chromosome surnuméraire est, dans cette plante, plus court que celui de la plante A.

Les anthères ne nous ont montré que des métaphases et télophases de la division hétérotypique, ainsi que quelques tétrades. De cette façon, nos observations se sont bornées à ces phases.

Dans les 76 figures de métaphase examinées, le chromosome surnuméraire s'est montré toujours accouplé avec lui-même (figs. 1-3, Pl. VII). Nous ne l'avons jamais trouvé non accouplé avec lui-même, ou apparié avec d'autres éléments de la garniture normale, formant des bivalents ou des trivalents. Bien qu'il soit plus petit, ce chromosome présente à la métaphase I des configurations semblables à celles qui ont été décrites à propos de la plante A, particulièrement des formes en fer à cheval. Comme dans la plante A, le chromosome surnuméraire peut se trouver, à la métaphase I, localisé (fig. 1, Pl. VII) dans le plan équatorial (39,4 % des cas), ou hors (figs. 2 et 3, Pl. VII) de celui-ci (60,6 %). Les pourcentages trouvés montrent que, chez la plante B, le chromosome surnuméraire se dispose plus souvent dans le plan équatorial que chez la plante A. Par suite de ce fait, la séparation de ce chromosome en deux chromatides est ici plus fréquente.

Lorsque le chromosome se place en plaque après la disjonction des bivalents, les phénomènes de séparation des deux chromatides découlent d'une façon comparable à celle que nous avons décrite pour la plante A (figs. 4-12, Pl. VII et fig. 1, Pl. VIII).

Lorsque le chromosome se localise hors du plan équatorial, son comportement est aussi semblable à celui décrit pour la plante A (figs. 2 et 3, Pl. VIII).

Des figures montrant des irrégularités pendant la séparation des chromatides ont été trouvées. Ainsi, les figures 4 et 5, Pl. VIII semblent montrer que, quelquefois, les chromatides se séparent avec difficulté, en restant attachés par les extrémités distales. La figure 6, Pl. VIII correspond très probablement à un pont qui a engendré un fragment très court.

En ce qui concerne les micronoyaux, nous devons

signaler que, bien qu'il existe une certaine variabilité, ils se colorent plus intensivement et ils se montrent plus compacts que les noyaux principaux (fig. 9, Pl. VII et figs. 7 et 8, Pl. VIII). Par rapport aux micronoyaux de la plante A, ils se présentent aussi plus compacts. Cependant, lorsque les chromosomes sont inclus dans les noyaux principaux (figs. 3 et 9, Pl. VIII), leur compacité est plus accentuée que celle des micronoyaux.

DISCUSSION

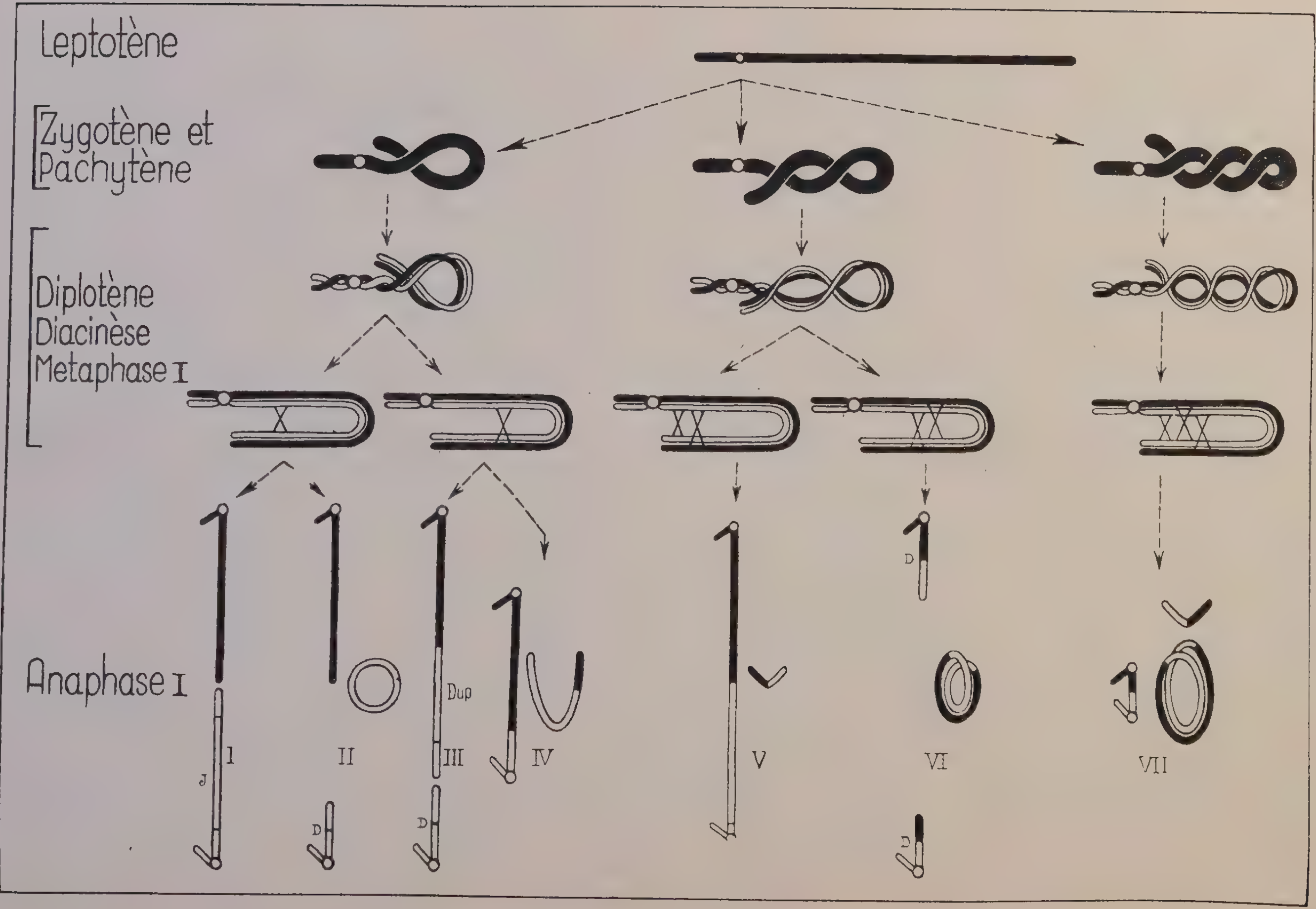
Le premier problème qui se pose est celui de savoir si l'accouplement est homologue ou non-homologue, puisque tous les faits observés peuvent aisément s'expliquer, en supposant que les chromosomes surnuméraires possèdent une longue duplication, invertie ou non. À notre avis, l'accouplement est non-homologue, pour les raisons suivantes:

1) Une observation au pachytène a montré que les chromomères ne sont pas homologues de part et d'autre des régions appariées (fig. text. 2 *a*);

2) Variabilité du point où le pliement a lieu, révélée par l'apparition, à la métaphase I, de formes cylindriques, pourvues d'un bec d'une longueur plus ou moins considérable (pliement vers la moitié de la branche longue), et de formes dépourvues de bec (pliement vers la moitié du chromosome). Une identique variabilité est montrée par les figures anaphasiques, dans lesquelles on peut constater que, dans quelques cas, les deux segments enroulés montrés par les chromatides sont inégaux et dans d'autres égaux;

3) L'accouplement du chromosome avec lui-même a lieu dans un pourcentage très élevé de cas (presque 100 %). Il ne faudrait pas s'attendre à un pourcentage aussi élevé si l'accouplement était dû à une duplication;

4) Nous avons observé jusqu'à présent la méiose de 7 plantes pourvues de chromosomes surnuméraires et nous avons constaté que, dans tous les cas, ils s'accouplaient avec eux-mêmes. Pour admettre que l'appariement est homologue dans tous ces cas, il faut supposer que tous ces


Leptotène
Zygotène et
Pachytène
Diplotène
Diacinèse
Metaphase I
Anaphase I
I
II
III
IV
V
VI
VII
Dup
D

chromosomes possèdent des duplications, ce qui n'est pas probable.

Étant donné que l'accouplement est non-homologue, nous pourrons expliquer les divers types de disjonction du chromosome surnuméraire au moyen des deux hypothèses suivantes :

1) *Formation de chiasmata d'après le type du « crossing-over » légitime.* — Le chromonema ou les chromonemata des chromosomes se trouvent enroulés en hélice, formant une sorte de cordon, qui est maintenu sous une certaine tension. Les attractions de l'hétérochromatine ne sont pas spécifiques, et, pour cette raison, les segments proximaux et distaux du chromosome s'attirent au zygotène, en provoquant le pliement du chromosome par un certain point. Les deux segments résultants du pliement s'accouplent l'un avec l'autre, et, lorsque cela arrive, les deux segments s'enroulent, par le fait que le sens de l'enroulement des chromonemata est inverse. Au pachytène, les deux segments apparaissent donc accouplés et enroulés l'un dans l'autre. Lorsque le chromosome se clive longitudinalement, le « relational coiling » fait son appari-

---

Fig. 20. — Schème explicatif du comportement du chromosome surnuméraire hétérochromatique pendant la division hétérotypique et de la naissance, parmi les nombreuses possibilités, des types de séparation observés à l'anaphase I, d'après l'hypothèse de la formation de chiasmata du type du « crossing-over » légitime. On suppose que le pliement a eu lieu vers le milieu de la branche longue.

I — Séparation d'un chromatide normal et d'un autre de longueur aussi normale, mais pourvu d'une longue inversion (I).

II — Séparation d'un chromatide normal, d'un chromatide court, déficient (D), et d'un anneau.

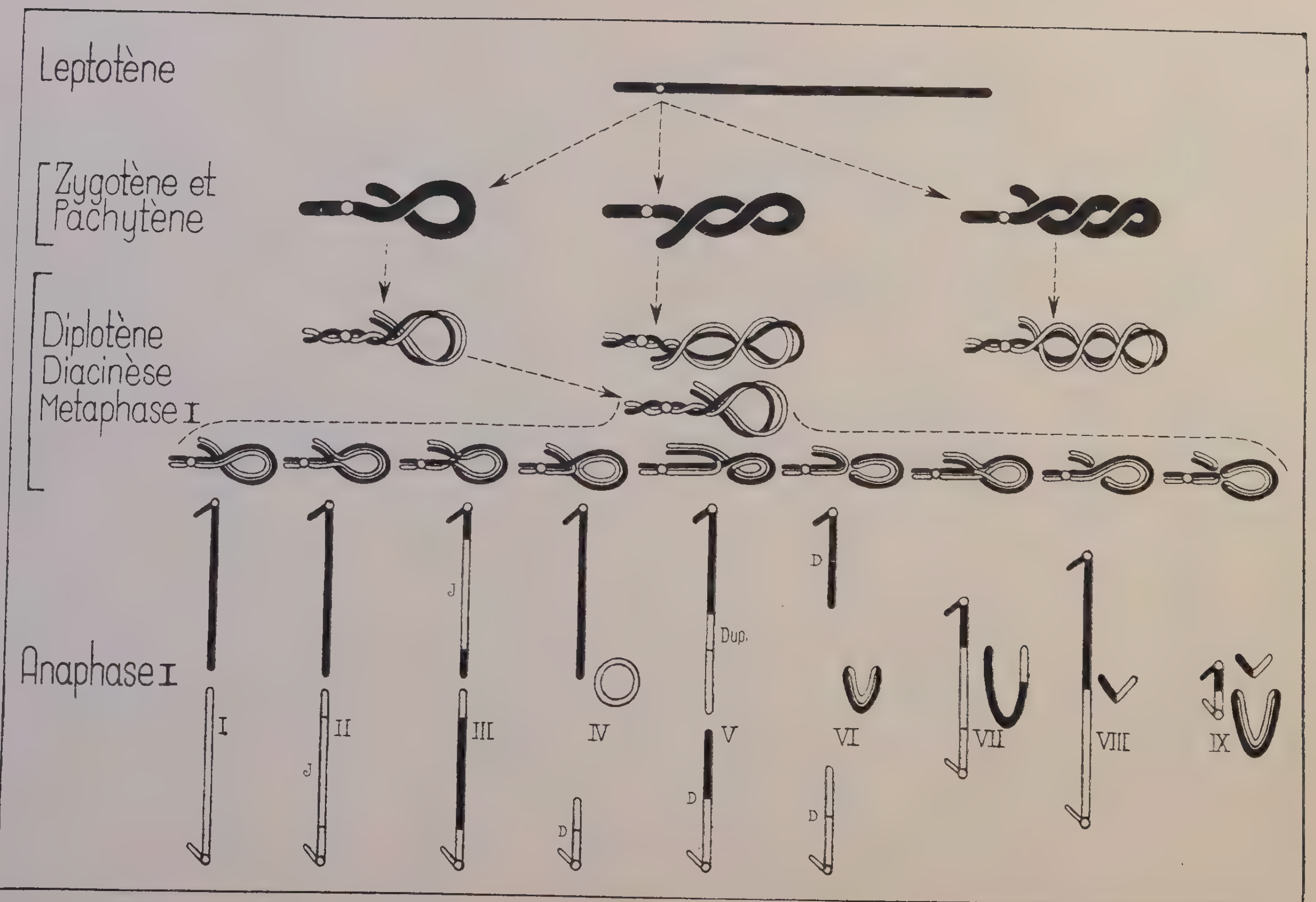
III — Séparation de deux chromatides inégaux: un très long, pourvu d'une longue duplication (Dup.), et un autre court, déficient (D).

IV — Formation d'un pont long et d'un fragment aussi long.

V — Formation d'un pont très long et d'un fragment court.

VI — Séparation de deux chromatides courts, déficients (D), et d'un fragment à taille moyenne.

VII — Formation d'un pont très court, d'un fragment long en U et d'un fragment court.


Leptotène
Zygotène et Pachytène
Diplotène
Diacinèse
Metaphase I
Anaphase I
I
II
III
IV
V
VI
VII
VIII
IX
J
J
D
D
D
D
Dup.

tion. Des chiasmata seront alors établis entre les quatre segments de la région où l'accouplement a eu lieu. Ces chiasmata défont le « relational coiling », mais les chromatides continuent à présenter l'enroulement du pachytène, dont la direction est la même sur les deux chromatides. Le chromosome se raccourcit, en même temps que les paires de chromatides se repoussent. Par suite des chiasmata, l'accouplement ne se défait pas à la diacinèse, et le chromosome continue à se montrer apparié avec lui-même à la métaphase I.

À l'anaphase I, les chiasmata se défont, et, lorsque le chromosome subit l'influence d'un fuseau et le centromère se clive, plusieurs types de disjonction pourront avoir lieu, selon le nombre et la position des chiasmata (v. le schème de la figure 20, où, parmi les nombreuses possibilités, le mécanisme de la formation des types de disjonction trouvés à l'anaphase I est expliqué).

2) *Occurrence de points de rupture et fusion, d'après le type du « crossing-over » illégitime.* — Les stades du

---

Fig. 21. — Schème explicatif du comportement du chromosome surnuméraire hétérochromatique pendant la division hétérotypique et de la naissance, parmi les nombreuses possibilités, des types de séparation observés à l'anaphase I, d'après l'hypothèse de l'occurrence de « crossing-over » du type illégitime. On suppose que le pliement a eu lieu vers le milieu de la branche longue.

I — Séparation de deux chromatides normaux.
II — Séparation d'un chromatide normal et d'un autre à longueur aussi normale, mais pourvu d'une longue inversion (I).
III — Séparation de deux chromatides à longueur normale, qui ont échangé les segments médians, dont l'un est inverti (I).
IV — Séparation d'un chromatide normal, d'un autre court, déficient (D), et d'un anneau.
V — Séparation de deux chromatids inégaux: un plus long, pourvu d'une duplication (D), et l'autre plus court, déficient (D).
VI — Séparation de deux chromatides égaux, déficients (D), et d'un fragment relativement long.
VII — Formation d'un pont long et d'un fragment aussi long.
VIII — Formation d'un pont très long et d'un fragment court.
IX — Formation d'un pont très court, d'un fragment long en U et d'un fragment court.

zygotène et du pachytène découleront de la façon décrite pour la première hypothèse. Lorsque le chromosome se clive longitudinalement et le «relational coiling» fait son apparition, les forces de répulsion entre les chromatides commencent à s'exercer et deux cas pourront probablement avoir lieu:

a) Par suite de l'enroulement du zygotène, le «relational coiling» ne pourra pas se défaire facilement, et il persistera jusqu'à la métaphase I, en maintenant les quatre segments accouplés (la «stickiness» de l'hétérochromatine pourra jouer aussi son rôle). À ce stade, le «relational coiling» se défera finalement et les deux chromatides, sans avoir subi aucune rupture, se sépareront avec les deux segments enroulés l'un dans l'autre;

b) En conséquence de la répulsion entre les paires de segments, des forces de traction s'exerceront sur les points de torsion, et ces forces pourront mener à des ruptures. Ces ruptures, suivies de la fusion des extrémités rompues, peuvent engendrer plusieurs types de disjonction, dont, parmi les nombreuses possibilités, ceux observés sont représentés dans le schème de la figure 21. Dans ces cas, les ruptures et fusions pourront défaire le «relational coiling», mais les quatre segments pourront persister accouplés jusqu'à la métaphase I au moyen des pseudo-chiasmata établis, et peut-être aussi à cause de la «stickiness» de l'hétérochromatine.

En analysant les deux hypothèses exposées, il nous semble que la deuxième est la plus probable, pour les raisons suivantes: 1) Pour expliquer l'apparition des types de disjonction V et VI (v. schème de la fig. 20), il faut admettre la formation de deux chiasmata très rapprochés, et, pour expliquer le type VII, il faut admettre la formation de trois chiasmata aussi très rapprochés (v. aussi la fig. 20). Étant donné ce que nous savons des phénomènes d'interférence, la formation de deux ou de trois chiasmata dans ces conditions n'est pas probable. Le fait que Darlington et Upcott (1941) ont montré que la fréquence de «crossing-over» des chromosomes hétérochromatiques est proportionnellement moindre, relativement à leur longueur, que

celle des chromosomes euchromatiques parle aussi dans le même but; 2) L'analyse soigneuse des fragments acinétiques, engendrés par quelques-uns des types de disjonction, montre que ceux-ci présentent une constitution qui s'accorde plutôt avec la deuxième hypothèse qu'avec la première (v. les figs. text. 10 et 12 et les schèmes des figs. 20 et 21). Nous pourrons donc conclure que les types de disjonction trouvés s'expliquent par l'occurrence de ruptures, suivies de la fusion des extrémités rompues. Au moyen de ce processus, des échanges de segments ont lieu entre les deux chromatides, échanges qui constituent le « crossing-over » non-homologue.

En considérant le « crossing-over » normal, nous constatons qu'il s'agit d'un processus de rupture et fusion (dans une région homologue de deux chromatides aussi homologues) d'où résulte l'échange de segments entre deux chromatides homologues. Étant donné ce fait, il n'y aura pas de différence essentielle entre le « crossing-over » homologue et le « crossing-over » non-homologue trouvé dans les chromosomes surnuméraires hétérochromatiques. DARLINGTON (1937, p. 166) dit que l'accouplement non-homologue « does not permit of crossing-over and chiasma-formation so far as we know, and the chromosomes will therefore fall apart unpaired at diplotene». Nos observations semblent montrer que, bien que des chiasmata en tout semblables à ceux de l'accouplement homologue ne soient pas formés, le «crossing-over» peut avoir lieu dans les cas de l'accouplement non-homologue de l'hétérochromatine. De l'autre côté, on constate que l'appariement ne se défait pas au diplotène, mais qu'il persiste jusqu'à la métaphase I. Ce fait pourrait être expliqué, soit par l'action des liaisons établies par les fusions (pseudo-chiasmata), soit par l'action du « relational coiling », soit encore par l'action de la « stickiness » de l'hétérochromatine. Il n'est pas facile de résoudre cette question. Cependant, nous supposons que tous ces facteurs pourront contribuer à maintenir les segments accouplés jusqu'à la métaphase I.

Étant donné les figures du pachytène, de la métaphase I et de l'anaphase I observées, il semble clair que les ruptures,

dans le cas des chromosomes hétérochromatiques que nous avons étudiés, sont provoquées par les forces de traction, apparues après la division longitudinale du chromosome, en conséquence de la répulsion entre les paires des segments appariés. Ces forces de traction s'exercent dans les régions tordues, et, par suite de l'action simultanée des forces de torsion et de traction, des ruptures s'engendreront dans les points d'entre-croisement, comme on peut aisément le constater au moyen d'un modèle construit avec deux cordons tordus, pliés sur eux-mêmes et enroulés l'un dans l'autre (v. fig. 21).

Il n'a pas été facile de mettre en évidence les forces qui engendrent le «crossing-over» homologue. Cependant, on suppose (v. Darlington, 1937) qu'il sera engendré par les mêmes forces qui nous avons admises pour le «crossing--over» non-homologue. De cette façon, on peut conclure que le «crossing-over» homologue et le non-homologue ne sont pas essentiellement différents, puisqu'ils seront provoqués par des forces identiques. Les différences semblent être dues aux faits que dans l'accouplement homologue de l'euchromatine les ruptures se produisent à la fois seulement sur deux chromatides et les fusions sont réciproques, tandis que, dans l'accouplement non-homologue de l'hétérochromatine, les ruptures pourront avoir lieu dans deux ou dans les quatre chromatides, et les fusions se font au hasard. Cette particularité pourra probablement être due au manque de spécificité caractéristique de l'hétérochromatine.

* * *

Une des conséquences les plus nettes du comportement des chromosomes surnuméraires hétérochromatiques est celle de la production de nouveaux types chromosomiques. Probablement, le plus souvent aucune rupture n'aura lieu. Dans ce cas, les chromatides qui se séparent sont semblables et normaux. Lorsque des ruptures ont lieu, différents types de chromatides pourront se former, en dehors des normaux: *a)* chromatides à longueur normale, pourvus

d'une inversion ; *b)* chromatides plus courts que le normal, déficients; *c)* chromatides plus longs que le normal, pourvus d'une duplication invertie; *d)* chromatides plus longs que le normal, pourvus d'une inversion et d'une duplication non-invertie; *e)* chromatides plus longs que le normal, pourvus d'un segment inverti et d'une duplication aussi invertie; etc.

Dans un travail antérieur (FERNANDES, 1943), nous avons suggéré que les différents types de chromosomes surnuméraires hétérochromatiques trouvés chez les diverses plantes de *N. Bulbocodium* doivent correspondre à autant de types différents de chromosomes de la garniture normale. Étant donné les faits mentionnés de la formation de différents types chromosomiques à partir d'un seul chromosome, cette suggestion doit être soumise à une révision. Cependant, nous devons déjà signaler que tous les types trouvés n'auront pas été forcément dérivés de chromosomes des types que nous avons trouvés dans les plantes A et B. Nous devrons donc conclure que, chez *N. Bulbocodium*, il y aura des chromosomes surnuméraires hétérochromatiques primitifs, en dehors d'autres dérivés. Ces chromosomes primitifs pourront correspondre à autant de chromosomes de la garniture normale devenus hétérochromatiques.

* * *

Une particularité des chromosomes surnuméraires hétérochromatiques consiste dans le fait qu'ils ne s'apparient pas avec les autres éléments de la garniture normale. Cette constatation a été prise comme évidence de ce que ces chromosomes n'ont pas d'homologues parmi les éléments de la garniture normale. À notre avis, cette constatation pourra ne pas être exacte, puisque les chromosomes primitifs de ce type doivent correspondre à des éléments de la garniture normale euchromatiques devenus hétérochromatiques. Le manque d'appariement doit être attribué à la nature hétérochromatique, puisque le passage de l'état euchromatique à l'état hétérochromatique pourra être

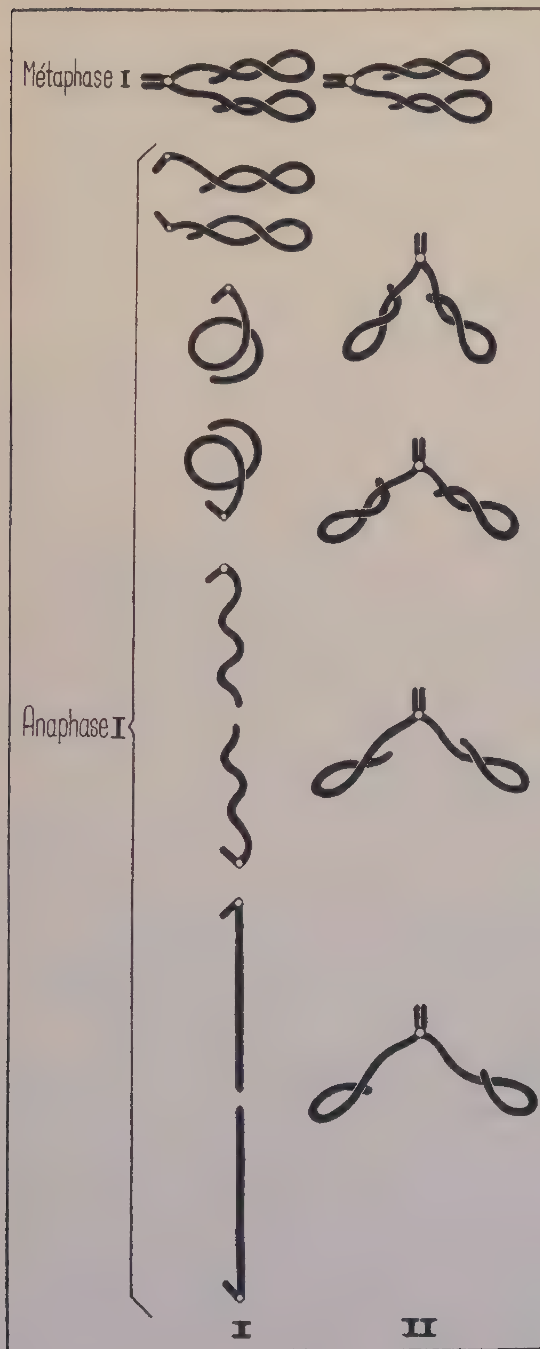
accompagné de modifications qui rendront impossible l'attraction entre ces deux états de la même substance. Nous pourrons penser encore que le manque d'appariement résulte des faits suivants: 1) L'hétérochromatine se présente au zygotène plus compacte que l'euchromatine, et, comme les chromomères ne pourront pas se correspondre, l'appariement ne pourra pas avoir lieu; 2) Les chromosomes s'accouplant avec eux-mêmes, leurs exigences d'appariement seront satisfaites par ce simple mécanisme et, par ce fait, ils n'auront pas la chance de s'accoupler avec les homologues euchromatiques.

Le fait que les chromosomes surnuméraires hétérochromatiques peuvent s'accoupler avec eux-mêmes d'une façon non-homologue rend manifeste l'absence de spécificité de l'hétérochromatine en ce qui concerne leurs capacités d'attraction et d'accouplement. Ce manque de spécificité est aussi mise en évidence par la formation des chromocentres dans les noyaux des glandes salivaires de *Drosophila* (PROKOFIEVA, 1935). Cette particularité doit aussi être responsable de l'accouplement observé chez quelques chromosomes des garnitures haploïdes (v. LEVAN, 1942 et la bibliographie citée par cet auteur).

* * *

Une fois les chromatides séparés, l'émigration polaire est accompagnée du déroulement des segments enroulés, comme la figure 22 le montre schématiquement. Lorsque le chromosome demeure au voisinage d'un des pôles, le centromère ne se clive pas, mais les chromatides s'écartent et le chromosome prend tout d'abord la forme d'un fer à cheval et plus tard celle d'un V largement ouvert. Ce fait montre que la séparation du corps des chromatides n'est pas sous la dépendance de la répulsion des centromères. Le déroulement a aussi lieu, mais les deux chromatides n'arrivent pas à se dérouler complètement (fig. 22).

Lorsque le chromosome ou les chromatides demeurent rejetés dans le cytoplasme, ils subissent la désintégration télophasique, en devenant des micronoyaux. Le degré de



cette désintégration est un peu variable, puisque, dans quelques cas, les micronoyaux présentent une structure comparable à celle des noyaux principaux, tandis que, dans d'autres, ils se présentent plus compacts. En tout cas, la compacité est toujours moindre que dans les cas où le chromosome ou les chromatides sont inclus dans les noyaux principaux. Étant donné que, dans ces derniers cas, ces élé-

Fig. 22.— Schème explicatif du déroulement des chromatides du chromosome surnuméraire.

I — Le chromosome se place en plaque équatoriale à l'anaphase I, le centromère se clive et les deux chromatides résultants marchent vers les pôles respectifs.

II — Le chromosome se localise au voisinage d'un des pôles et il est inclus dans un des groupes polaires. Le centromère ne se clive pas et les deux chromatides s'écartent progressivement, en même temps que le déroulement des deux segments a lieu. Ce déroulement, en général, n'est pas rendu complet.

ments restent compacts, il semble que, lorsqu'ils sont au-dedans des noyaux, la désintégration télophasique est suspendue. Cette suspension ne pourra donc être due qu'à une action génique, c'est-à-dire à l'action de quelque produit engendré soit par un gène, soit par un complexe de gènes. Il semble donc que l'hétérochromaticité est génétiquement contrôlée. La comparaison des micronoyaux de la plante A et de la plante B montre que ceux de la dernière sont, d'une façon générale, plus compacts. Pour le moment, nous ne savons pas expliquer ce phénomène. Est-ce-qu'il s'agit de simples variations phénotypiques?

* * *

Les observations effectuées particulièrement dans la plante A ont montré que, lorsque le chromosome surnuméraire demeure dans le cytoplasme écarté des bivalents, un fuseau actif peut se développer. Ce fuseau peut profiter d'un des pôles du fuseau principal (fuseau tripolaire), ou bien il peut posséder des pôles indépendants. L'apparition de ces fuseaux dans n'importe qu'elle région montre que tout le cytoplasme peut réagir à l'introduction d'un chromosome, en donnant origine à un fuseau. L'influx pour la formation du fuseau doit sans doute partir du chromosome, et, par le fait qu'à ce moment le centromère est l'organite le plus actif du chromosome, il est légitime de supposer que cet influx émanera du centromère lui-même (v. White, 1942, p. 25).

Le fait que le fuseau développé par le chromosome peut profiter d'un des pôles du fuseau principal montre que la cellule a une tendance bipolaire. Cependant, la formation de fuseaux indépendants montre que toute la région du cytoplasme peut s'organiser en pôle. Chez les plantes supérieures, il n'y aura donc pas de centromères soit visibles, soit invisibles (pour la discussion de ce sujet et pour les références bibliographiques v. Tischler, 1942).

Lorsque le chromosome demeure dans le plan équatorial de la cellule, mais à une petite distance des bivalents, le fuseau qu'il engendre peut se fusionner avec le fuseau

principal. Cette observation s'accorde avec l'idée de DARLINGTON et UPCOTT (1941), d'après laquelle le fuseau principal serait engendré par la soudure précoce des é éments fuseauriels correspondant à chacun des chromosomes de la garniture.

Le fuseau accessoire est actif, puisque le centromère du chromosome se clive et les deux chromatides émigrent vers les pôles respectifs.

Se basant sur le comportement mitotique des chromosomes B de *Zea Mays*, DARLINGTON et UPCOTT (1941) sont amenés à conclure que ces chromosomes possèdent des centromères faibles relativement à la charge qu'ils doivent transporter. Bien que le chromosome surnuméraire de la plante A soit assez long (aussi long que les plus longs de la garniture normale) et par conséquent assez lourd, nous n'avons jamais constaté d'irrégularités pendant la mitose. En effet, le centromère de ce chromosome se clive en même temps que les autres, et la migration des chromatides à l'anaphase découle aussi régulièrement. Pendant la méiose, nous n'avons constaté aussi aucune irrégularité pouvant s'attribuer à la faiblesse du centromère. Nous devons donc conclure que, comme il arrive chez *Secale cereale* (MÜNTZING, 1946), les centromères des chromosomes surnuméraires de *N. Bulbocodium* sont normaux.

* * *

En ce qui concerne l'origine des chromosomes surnuméraires hétérochromatiques, FERNANDES (1943) a suggéré qu'ils pourraient être engendrés au moyen du croisement de triploïdes avec des diploïdes possédant soit un gène, soit un complexe de gènes, contrôlant la quantité de chromatine active des noyaux. Lorsque des chromosomes surnuméraires euchromatiques seraient inclus dans les noyaux de plantes possédant ce gène ou ce complexe de gènes, ils seraient rendus hétérochromatiques et, par conséquent, inactifs. Ces plantes auraient donc la capacité génique de contrôler la quantité de chromatine active. Dans le cas où cette hypothèse serait exacte, les chromosomes hétérochromatiques correspondraient à des chromosomes euchroma-

tiques de la garniture, rendus hétérochromatiques par une action génique. De cette façon, la conversion de l'euchromatine en hétérochromatine devrait être réversible, c'est-à-dire que les chromosomes hétérochromatiques devraient devenir euchromatiques, lorsqu'ils seraient inclus dans les noyaux de plantes ne possédant pas, dans leur génome, les gènes contrôlant la quantité de chromatine active.

Néanmoins, une autre hypothèse pourra encore être envisagée: — Comme il est bien connu, la méiose des hybrides, des formes à degré impair de polyploïdie, des formes polysomiques et parfois même celle des plantes diploïdes amène à la formation de micronoyaux, qui correspondent, le plus souvent, à des chromosomes retardataires qui n'ont pas été inclus dans les noyaux principaux. Ces micronoyaux peuvent persister dans le cytoplasme et être rencontrés dans les microspores (v. FERNANDES, 1937, p. 203 et 204, et CHANDLER, PORTERFIELD et STOUT, 1937). Par suite de cette persistance dans le cytoplasme, la chromatine de ces chromosomes subirait une dégénérescence se traduisant par des altérations chimiques encore inconnues, qui mèneraient à la conversion de l'euchromatine en hétérochromatine. Le centromère des chromosomes constitutifs de ces micronoyaux ne subirait pas de modification, en restant actif. Les micronoyaux pourraient n'avoir pas encore été résorbés au moment de la première division du noyau du grain de pollen, et, particulièrement ceux localisés au voisinage du pôle du noyau de la cellule génératrice, pourraient, probablement à l'anaphase ou à la télophase, être inclus dans le groupe polaire qui engendrera ce même noyau de la cellule génératrice. De cette façon, les chromosomes rejetés dans le cytoplasme pourraient rejoindre, dans les noyaux générateurs, les autres chromosomes, et être ainsi inclus dans les garnitures. Ces chromosomes présenteraient alors le caractère pycnotique acquis pendant leur permanence dans le cytoplasme, et ils accompagneraient dans l'avenir les autres chromosomes, par le fait qu'ils seraient pourvus de centromères actifs. D'après cette hypothèse, l'hétérochromaticité ne serait pas génétiquement contrôlée et elle serait irréversible.

Les chromosomes hétérochromatiques seraient donc des chromosomes euchromatiques dégénérés.

Des recherches dans le but de confirmer ou infirmer ces deux hypothèses ont été déjà entreprises, et, d'après ce qui nous avons déjà observé, la deuxième est la plus probable.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

1 — Pendant la mitose, les chromosomes surnuméraires longs de *Narcissus Bulbocodium* se comportent d'une façon comparable à celle qui a été décrite pour les chromosomes du même type existant chez *N. juncifolius* (FERNANDES, 1939), ce qui montre leur nature hétérochromatique.

2 — Au pachytène, les chromosomes surnuméraires hétérochromatiques s'accouplent avec eux-mêmes au moyen du mécanisme suivant: pliement, soit vers le milieu du chromosome, soit vers le milieu de la branche longue, soit encore à un autre point, et enroulement, par torsion, des deux segments résultants du pliement.

3 — L'appariement ne résulte pas de l'existence de duplications dans les chromosomes, mais il est non-homologue, pour les raisons suivantes: *a)* manque d'homologie entre les chromomères appariés; *b)* variabilité de la position du point où le pliement a lieu; *c)* pourcentage très élevé des cas (presque 100 °/₀) dans lesquels l'accouplement a été constaté; *d)* apparition de ce type d'appariement dans tous les sept chromosomes hétérochromatiques observés jusqu'à présent.

4 — Bien que l'accouplement soit non-homologue, les chromosomes hétérochromatiques persistent appariés avec eux-mêmes jusqu'à la fin de la métaphase I, comme les véritables bivalents. À notre avis, ce fait doit être attribué au « relational coiling », à l'établissement de pseudo-chiasmata (voir ci-dessous) et à la « stickiness » de l'hétérochromatine agissant ensemble.

5 — Lorsque les chromosomes hétérochromatiques se placent dans le plan équatorial, le centromère se clive et les types suivants de disjonction ont été observés: séparation de deux chromatides égaux; séparation de deux chromatides inégaux; séparation de deux chromatides et d'un fragment relativement long; formation d'un pont assez long et d'un fragment très court; formation d'un pont long et d'un fragment à taille moyenne; formation d'un pont très court, accompagné d'un fragment long en U et d'un autre très court; et séparation de deux chromatides inégaux et d'un anneau.

Pour expliquer ces types de disjonction, deux hypothèses ont été suggérées: *a)* formation de chiasmata d'après le type du «crossing-over» légitime; *b)* occurrence de points de rupture et fusion d'après le type du «crossing-over» illégitime. Entre ces deux hypothèses, la deuxième nous semble la plus probable, pour les raisons suivantes: *a)* pour expliquer l'apparition des types de disjonction V, VI et VII (v. fig. text. 20), il faut admettre l'occurrence de deux ou de trois chiasmata très proches, ce qui n'est pas probable d'après ce que nous savons des phénomènes d'interférence et du fait, mis en évidence par Darlington et Upcott (1941), que, dans les chromosomes hétérochromatiques, la fréquence de «crossing-over» est proportionnellement moindre, relativement à leur longueur, que dans les chromosomes euchromatiques; *b)* les fragments acinétiques engendrés par quelques-uns des types de disjonction présentent une conformation qui s'accorde plutôt avec la deuxième hypothèse qu'avec la première. Les types de disjonction doivent donc être engendrés par l'occurrence de ruptures, suivies de la fusion des extrémités rompues. Par suite de ce mécanisme, des échanges de segments entre les deux chromatides («crossing-over» non-homologue) pourront avoir lieu.

6 — Étant donné que, au pachytène, les deux segments résultants du pliement s'enroulent l'un dans l'autre, et que le «relational coiling» fait son apparition après la division longitudinale des chromosomes, des forces de traction

s'exerceront sur les régions tordues, lorsque les paires de segments se repoussent. Ces forces mèneront à la rupture, à un certain point d'entre-croisement, soit de deux des quatre segments appariés, soit de tous les quatre. La fusion, faite au hasard, des extrémités rompues, deux à deux, aurait pour conséquence le «crossing-over» non-homologue.

7 — Le «crossing-over» homologue de l'euchromatine et le non-homologue de l'hétérochromatine ne sont pas essentiellement différents, puisqu'ils seront provoqués par des forces identiques. Les différences semblent être dues aux faits que dans le premier les ruptures ont lieu, à la fois, seulement sur deux des chromatides et les fusions sont réciproques, tandis que dans le deuxième les ruptures pourront avoir lieu dans deux ou dans les quatre segments et les fusions se font au hasard. Cette dernière particularité pourra être due au manque de spécificité de l'hétérochromatine.

8 — Par suite du «crossing-over» non-homologue, de nouveaux types chromosomiques peuvent être engendrés: chromosomes à longueur normale pourvus d'une inversion, chromosomes déficients plus courts que le chromosome normal, chromosomes plus longs que le chromosome normal pourvus d'une inversion et d'une duplication invertie, chromosomes plus longs que le chromosome normal pourvus d'un segment inverti et d'une duplication aussi invertie, etc. Il y en aura donc, parmi les chromosomes hétérochromatiques, des types primitifs et d'autres dérivés.

9 — Lorsque le centromère des chromosomes hétérochromatiques se clive à l'anaphase I, la migration polaire des chromatides est accompagnée du déroulement des segments enroulés. Ce déroulement peut ou non être rendu complet avant l'inclusion des chromatides dans les groupes polaires. Le plus souvent, cependant, les chromatides demeurent rejetés dans le cytoplasme, où ils devien-

nent des micronoyaux. Pendant l'anaphase I, les chromatides montrent une fente longitudinale assez nette, ce qui montre qu'ils sont déjà clivés pour la division suivante. Dans les chromosomes hétérochromatiques, la fissuration longitudinale n'a donc pas lieu à l'interphase, mais à la prophase ou à la métaphase de la division antérieure.

10 — Lorsque les chromosomes demeurent au voisinage d'un des pôles, le centromère ne se clive pas, mais les chromatides s'écartent, en prenant tout d'abord la forme d'un fer à cheval et plus tard celle d'un V plus ou moins ouvert. En même temps, les segments se déroulent, mais ce déroulement n'est pas rendu complet. Ces faits montrent que la séparation du corps des chromatides n'est pas sous la dépendance de la répulsion des centromères.

11 — Lorsque le chromosome ou les chromatides ne sont pas inclus dans les groupes polaires, ils demeurent dans le cytoplasme, où ils deviennent des micronoyaux. Bien qu'il existe une certaine variabilité, on constate que ces micronoyaux présentent une structure moins compacte que celle présentée par les chromosomes ou les chromatides lorsqu'ils sont inclus dans les noyaux principaux. Il semble donc que, dans ce dernier cas, la désintégration télophasique des chromosomes hétérochromatiques est suspendue lorsque la membrane nucléaire est formée. Cette suspension devra probablement être attribuée à une action génique, c'est-à-dire à l'action d'un gène ou d'un complexe de gènes existant dans la garniture normale. Il semble donc que l'hétérochromaticité est génétiquement contrôlée.

12 — Le fait que les chromosomes hétérochromatiques ne s'apparient avec aucun élément de la garniture normale a été pris comme évidence de ce que ces chromosomes n'ont pas d'homologues parmi les chromosomes de la garniture normale. À notre avis, les chromosomes hétérochromatiques primitifs (v. ci-dessus) doivent correspondre à des éléments euchromatiques de la garniture normale devenus hétérochromatiques. Le manque d'appariement

pourra être dû au fait que le passage de l'état euchromatique à l'état hétérochromatique est accompagné d'altérations qui rendront impossible l'attraction entre ces deux états différents de la même substance.

13 — Le fait que les chromosomes hétérochromatiques peuvent s'accoupler avec eux-mêmes d'une façon non-homologue rend manifeste le manque de spécificité de l'hétérochromatine en ce qui concerne leurs capacités d'attraction. L'appariement quelquefois observé entre des éléments de garnitures haploïdes est sans doute dû à cette particularité de l'hétérochromatine.

14 — Lorsque les chromosomes hétérochromatiques ne sont pas inclus dans le fuseau principal, ils peuvent engendrer un autre fuseau. Ce fuseau pourra se fusionner complètement avec le principal, se fusionner partiellement en formant avec le principal un fuseau tripolaire, ou rester complètement indépendant. Dans tous ces cas, le centromère se clive en général et les chromatides émigrent vers les pôles respectifs.

15 — L'apparition de fuseaux à n'importe quelle région du contenu cellulaire montre que tout le cytoplasme peut réagir à l'introduction d'un chromosome, en donnant origine à un fuseau. Par le fait que le centromère est l'organite le plus actif du chromosome à ce stade, l'influx pour la formation du fuseau devra partir du centromère lui-même.

16 — Bien que les cellules aient une tendance bipolaire, la formation de fuseaux indépendants du fuseau principal montre que toute la région du cytoplasme peut s'organiser en pôle. Chez les plantes supérieures, il n'y aura donc pas de centrosomes soit visibles, soit invisibles.

17 — Il est probable que, d'accord avec les idées de Darlington et Upcott (1941), le fuseau principal soit formé par la soudure précoce des éléments fuseauriels correspondant à chacun des éléments de la garniture.

18 — Aucune irrégularité pouvant s'attribuer à la faiblesse du centromère des chromosomes hétérochromati-

ques n'a été trouvée pendant la mitose et la méiose. Les centromères des chromosomes hétérochromatiques de *N. Bulbocodium* doivent donc être normaux.

19 — L'observation de tétrades a montré que les chromosomes hétérochromatiques peuvent, tout au moins dans quelques cas, subir deux divisions successives pendant la méiose, c'est-à-dire se diviser à la division hétérotypique et à la division homéotypique.

20 — L'origine des chromosomes surnuméraires hétérochromatiques reste encore mystérieuse. Pour l'expliquer, deux hypothèses de travail sont suggérées. La première admet que ces chromosomes sont engendrés par suite de croisements entre des triploïdes et des diploïdes, possédant dans leurs génomes un gène ou un complexe de gènes contrôlant la quantité de chromatine active. La deuxième suppose que les chromosomes surnuméraires hétérochromatiques correspondent à des chromosomes euchromatiques dégénérés, à cause de leur permanence dans le cytoplasme sous la forme de micronoyaux. Ces chromosomes, probablement pendant la première division du noyau du grain de pollen, rejoindraient les autres éléments de la garniture normale, par suite de l'inclusion des micronoyaux dans les noyaux des cellules génératrices.

BIBLIOGRAPHIE

AVDULOV, N. P.

1933 On the additional chromosomes in maize. *Bull. appl. Bot.*, 101-130.

AVDULOV, N. P. et TITOVA, N.

1933 Additional chromosomes in *Paspalum stoloniferum* Bosco. *Bull. appl. Bot.*, 165-172.

CHANDLER, C., PORTERFIELD, W. M. et STOUT, A. B.

1937 Microsporogenesis in diploid and triploid types of *Lilium tigrinum* with special references to abortions. *Cytologia*, **Fujii Jubilaei Volumen**, 756-784.

DARLINGTON, C. D.

1937 *Recent Advances in Cytology.* 2nd ed. London: Churchill.

1941 Polyploidy, crossing-over and heterochromatin in *Paris. Ann. Bot.*, **5** (n. s.), 203-216.

DARLINGTON, C. D. et JANAKI-AMMAL, E. K.
1945 Adaptive isochromosomes in *Nicandra*. *Ann. Bot.*, **9** (n. s.), 267-281.

DARLINGTON, C. D. et LA COUR, L. F.
1945 Chromosome breakage and the nucleic acid cycle. *J. Genetics*, **46**, 180-251.

DARLINGTON, C. D. et THOMAS, P. T.
1941 Morbid mitosis and the activity of inert chromosomes in *Sorghum*. *Proc. Roy. Soc. London*, **130**, 127-150.

DARLINGTON, C. D. et UPCOTT, M. B.
1941 The activity of inert chromosomes in *Zea Mays*. *J. Genetics*, **41**, 275-296.

FERNANDES, A.
1934 Nouvelles études caryologiques sur le genre *Narcissus* L. *Bol. Soc. Broteriana*, **9** (2.ª série), 3-198.
1936 Les satellites chez les Narcisses. II. Les satellites pendant la mitose. *Bol. Soc. Broteriana*, **11** (2.ª série), 88-146.
1937 Le problème de *Narcissus Tazetta* L. I — Les formes à 22 chromosomes somatiques. *Bol. Soc. Broteriana*, **12** (2.ª série), 159-219.
1939 Sur le comportement d'un chromosome surnuméraire pendant la mitose. *Scientia Genetica*, **1**, 141-166.
1943 Sur l'origine des chromosomes surnuméraires hétérochromatiques chez *Narcissus Bulbocodium* L. *Bol. Soc. Broteriana*, **17** (2.ª série), 251-256.

FERNANDES, A. et SERRA, J. A.
1944 Euchromatine et hétérochromatine dans leurs rapports avec le noyau et le nucléole. *Bol. Soc. Broteriana*, **19** (2.ª série), 67-124.

HAKANSSON, A.
1945 Überzählige Chromosomen in einer Rasse von *Godetia nutans* Hiorth. *Bot. Notiser*, 1-19.

LA COUR, L. F.
1937 Improvements in plant cytological technique. *Bot. Rev.*, **5**, 241-258.
1945 *in* John Innes Horticultural Institution thirty-fifth Annual Report, 12-14.

LEVAN, A.
1942 Studies on the meiotic mechanism of haploid rye. *Hereditas*, **28**, 177-211.

MCCLINTOCK, B.
1933 The association of nonhomologous parts of chromosomes in mid-prophase of meiosis in *Zea Mays*. *Zeits. Zellf. u. mikr. Anat.*, **19**, 191-237.

MÜNTZING, A.
1943 Genetical effects of duplicated fragment chromosomes in rye. *Hereditas*, **29**, 91-112.
1944 Cytological studies of extra fragment chromosomes in rye. I. Iso-fragments produced by misdivision. *Hereditas*, **30**, 231-248.
1945 Cytological studies of extra fragment chromosomes in rye. II. Transmission and multiplication of standard fragments and iso-fragments. *Hereditas*, **31**, 457-477.

MÜNTZING, A.

1946 Cytological studies of extra fragment chromosomes in rye. III. The mechanism of non-disjonction at the pollen mitosis. *Hereditas*, **32**, 97-119.

POWERS, L. et DAHL, A. O.

1937 Failure of diakinesis and metaphase pairing and the behavior during meiosis of univalent chromosomes in *Zea Mays. Journ. Agric. Res.*, **54**, 655-668.

PROKOFIEVA, A.

1935 Structure of the chromocentre. *C. R. Acad. Sci. U. S. S. R.*, **2**, 498.

RANDOLPH, L. F.

1928*a* Types of supernumerary chromosomes in maize. *Anat. Rec.*, **41**, 102.

1928*b* Chromosome numbers in *Zea Mays* L. *Mem. Cornell Agric. Exp. Sta.*, n.° 117, 1-44.

1941 Genetic characteristics of the B chromosomes in maize. *Genetics*, **26**, 608-631.

RHOADES, M. M.

1936 A cytogenetic study of a chromosome fragment in maize. *Genetics*, **21**, 491-502.

1938 On the origin of a secondary trisome through the doubling of a half--chromosome fragment. *Genetics*, **23**, 163-164.

TISCHLER, G.

1942 *Allgemeine Pflanzenkaryologie*, **2**. Gebrüder Borntraeger. Berlin--Zehlendorf.

WHITE, M. J. D.

1942 *The chromosomes*. Methuen & Co. Ltd., London.

EXPLICATION DES PLANCHES

Sauf la figure 1 de la planche I, toutes les autres ont été obtenues de préparations de frottis d'anthères colorés au carmin-acétique.

PLANCHE I

Plante A

Fig. 1. — Coupe transversale de la périphérie du méristème radiculaire. Remarquer, dans quelques noyaux, le chromocentre engendré par le chromosome surnuméraire. Navachine-violet de gentiane. × 850.

Fig. 2. — Pachytène. Le chromosome surnuméraire n'a pas pu être identifié. Remarquer l'hétérochromatine compacte, attachée au nucléole, indiquée par la flèche. Cette hétérochromatine correspond à l'extrémité de la branche du chromosome satellitifère à laquelle se relie le filament du satellite. × 800.

Fig. 3. — Pachytène où le chromosome surnuméraire n'a pas pu être identifié. Remarquer l'hétérochromatine de l'extrémité de la branche du chromosome satellitifère (flèche), le filament et le satellite attachés au nucléole. × 1.000.

Fig. 4. — Pachytène. La flèche indique le chromosome surnuméraire, dont la région distale se montre constituée par deux segments enroulés l'un dans l'autre. Confronter avec la fig. text. 2*b*. × 800.

Fig. 5. — Pachytène. Les flèches simples indiquent les limites du chromosome surnuméraire et la flèche double la région où les gros chromomères de l'extrémité distale sont appariés avec d'autres, moins volumineux, de la région voisine du centromère. × 850.

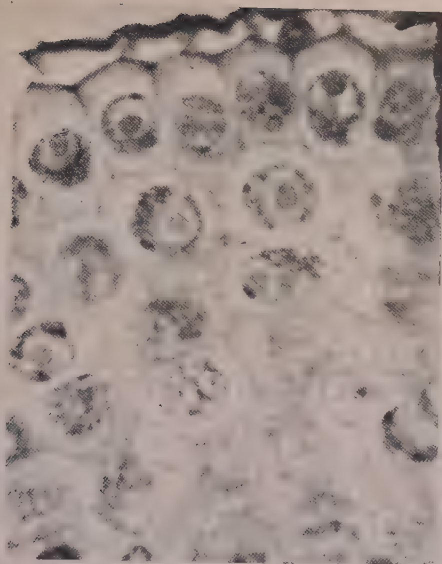
Fig. 6. — Pachytène. La flèche indique le chromosome surnuméraire, qui est ici assez compact. × 1.000.

Fig. 7. — Pachytène. La flèche indique le chromosome surnuméraire, assez compact, plié vers son milieu. × 850.

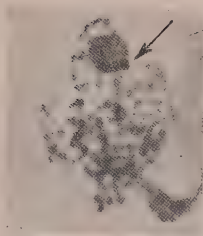
Fig. 8. — Métaphase I montrant quatre bivalents longs, trois plus petits et le chromosome surnuméraire (flèche) ayant l'aspect d'un fer à cheval avec les branches très rapprochées. × 850.

Figs. 9 et 10. — Métaphases I montrant le chromosome surnuméraire localisé dans la région comprise entre le plan équatorial et un des pôles. × 850.

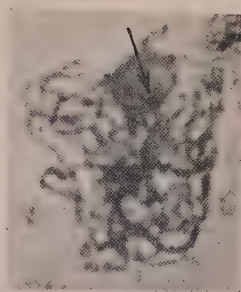
Fig. 11. — Métaphase I montrant le chromosome surnuméraire localisé au voisinage d'un des pôles. × 850.



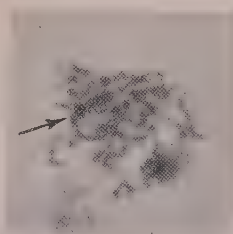
1



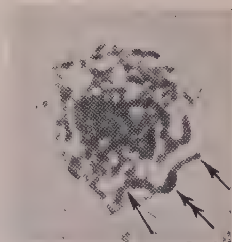
2



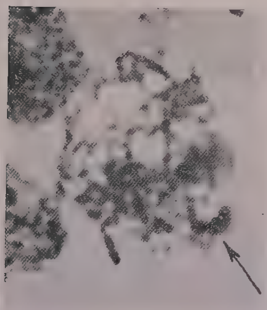
3



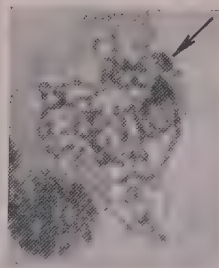
4



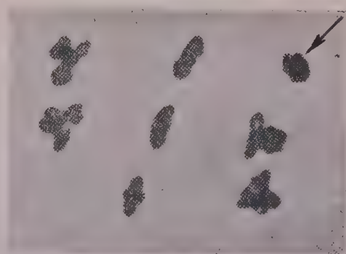
5



6



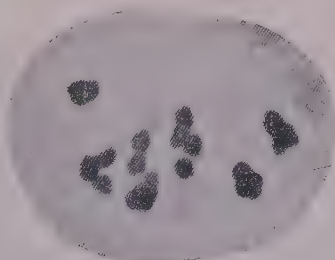
7



8



9



10



11

PLANCHE II

Plante A

Fig. 1. — Métaphase I montrant 7 bivalents et le chromosome surnuméraire, avec la forme d'un fer à cheval, localisé au voisinage d'un des pôles.

Fig. 2. — Vue de profil de la métaphase I montrant le chromosome surnuméraire, pourvu d'un bec, localisé dans le plan équatorial.

Fig. 3. — Chromosome surnuméraire métaphasique pourvu d'un bec relativement long.

Fig. 4. — Métaphase I. Le chromosome surnuméraire, qui présente la forme d'un anneau, se trouve localisé dans la région d'un des pôles.

Fig. 5. — Début de la télophase I. Le chromosome surnuméraire, non--accouplé avec lui-même, a engendré deux chromatides, qui n'ont pas réussi à gagner les groupes polaires respectifs avant la télophase. Remarquer la fissuration longitudinale (flèche).

Fig. 6. — Anaphase I. Premier stade de la séparation des deux chromatides du chromosome surnuméraire (flèche). Remarquer deux liaisons ayant l'aspect de chiasmata en train de se défaire.

Fig. 7. — Anaphase I. Un stade légèrement plus avancé que celui de la figure précédente. Remarquer aussi deux liaisons simulant des chiasmata sur le point de se défaire.

Fig. 8. — Anaphase I. Un stade encore plus avancé que celui de la figure précédente.

Fig. 9. — Anaphase I. Les deux chromatides se sont déjà séparés. Remarquer l'enroulement des chromatides. Confronter avec la fig. text. 7.

Figs. 10 et 11. — Idem. Les chromatides (flèches) émigrent vers les pôles. L'enroulement des chromatides supérieurs montre que les deux segments enroulés possèdent la même longueur, et, par conséquent, que le pliement a eu lieu vers le milieu du chromosome. Le déroulement dans les chromatides inférieurs est plus avancé que dans les supérieurs. Confronter la fig. 11 avec la fig. text. 8.

× 850.

PLANCHE III

Plante A

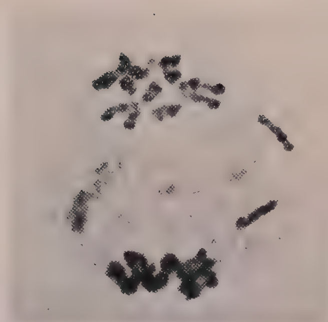
Figs. 1-7. — Anaphases I. Stades successifs de l'ascension polaire et du déroulement des deux chromatides-fils. Dans la fig. 7, le chromatide supérieur se présente complètement distendu, tandis que l'inférieur se présente encore un peu enroulé. × 850.

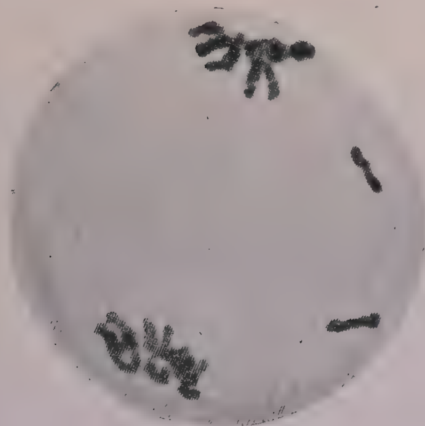
Fig. 8. — Télophase I. Chacun des chromatides a été inclus dans le noyau-fils respectif. Remarquer la compacité. × 700.

Fig. 9. — Télophase I. Les deux chromatides ont été rejetés dans le cytoplasme, où ils sont devenus des micronoyaux. Remarquer que la structure de ces micronoyaux est presque comparable à celle des noyaux principaux. × 850.

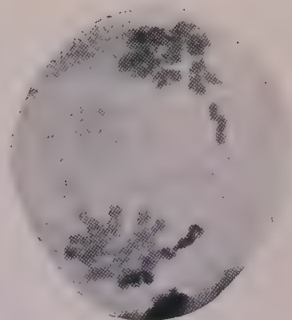

1


2

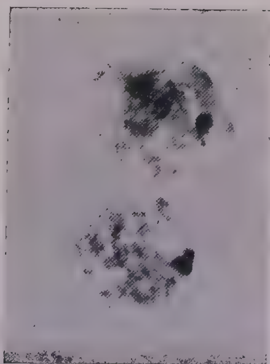

3


4


5


6


7


8

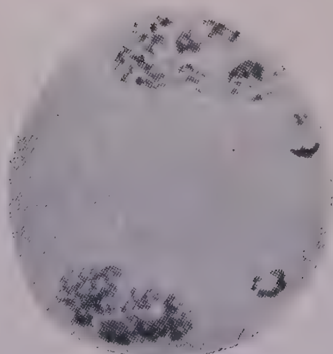

9

PLANCHE IV

Plante A

Figs. 1-3. — Télophases I montrant deux micronoyaux engendrés par les chromatides du chromosome surnuméraire. Remarquer que, dans les figs. 1 et 2, les micronoyaux présentent une structure comparable à celle des noyaux principaux, tandis que, dans la fig. 3, ils se montrent plus compacts.

Figs. 4 et 5. — Séparation de chromatides inégaux. Confronter la fig. 4 avec la fig. text. 9*b*, et la fig. 5 avec la fig. text. 9*a*.

Fig. 6. — Séparation de deux chromatides inégaux, qui ont gagné les pôles à temps d'être inclus dans les groupes polaires.

Fig. 7. — Le chromosome surnuméraire a engendré un pont très long et un fragment assez court.

Figs. 8 et 9. — Deux photographies de la même cellule prises à des niveaux différents. Le chromosome surnuméraire a engendré un pont très court, un fragment long en U et un autre fragment assez court. L'analyse du groupe polaire supérieur montre, en toute évidence, que le pont a été engendré par le chromosome surnuméraire et non par quelque bivalent de la garniture normale. Confronter avec la fig. text. 12.

× 850.

PLANCHE V

Plante A

Fig. 1. — Métaphase I. Le chromosome surnuméraire, localisé au voisinage d'un des pôles, se présente constitué par un anneau (flèche simple) et par une autre formation (flèche double), qui a été interprétée comme deux chromatides inégaux encore reliés par le centromère.

Fig. 2. — Anaphase I. Le chromosome surnuméraire a engendré un fuseau qui s'est soudé avec le fuseau principal. Confronter avec la fig. text. 13.

Fig. 3. — Comme dans la figure précédente, mais les deux chromatides se sont partiellement déroulés avant la division du centromère.

Fig. 4. — Le chromosome surnuméraire, localisé au voisinage du plan équatorial, a engendré un fuseau qui ne s'est pas soudé avec le fuseau principal. Confronter avec la fig. text. 14.

Fig. 5. — Début de la télophase I. Le chromosome surnuméraire s'est divisé en un fuseau indépendant, et deux micronoyaux sont sur le point de se former dans les régions des pôles de ce fuseau.

Fig. 6. — Anaphase I. Le chromosome surnuméraire (flèche), situé au voisinage d'un des pôles, montre un aspect en fer à cheval et des liaisons entre les deux branches. Ces liaisons simulent des chiasmata sur le point de se défaire.

Fig. 7. — Anaphase I. Le chromosome surnuméraire (flèche), localisé au voisinage d'un des pôles, montre encore la forme d'un fer à cheval.

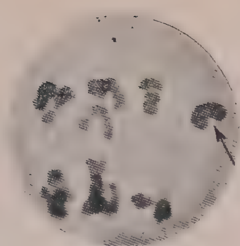
Figs. 8-10. — Anaphases I. Stades successifs de l'écartement des deux chromatides du chromosome surnuméraire au fur et à mesure que l'anaphase avance. Le centromère ne se clive pas.

Fig. 11. Moitié d'une télophase I, montrant le chromosome surnuméraire (flèche) subissant la désintégration télophasique à un degré comparable à celui des chromosomes de la garniture normale.

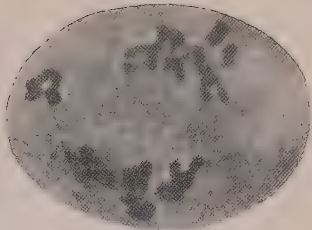
× 850.



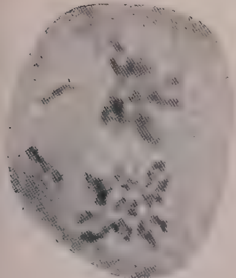
1



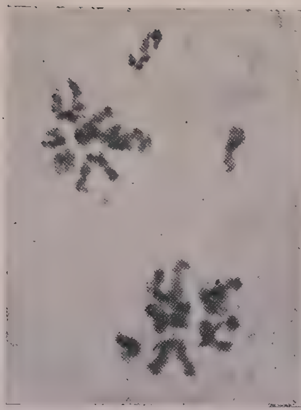
2



3



4



5



6



7



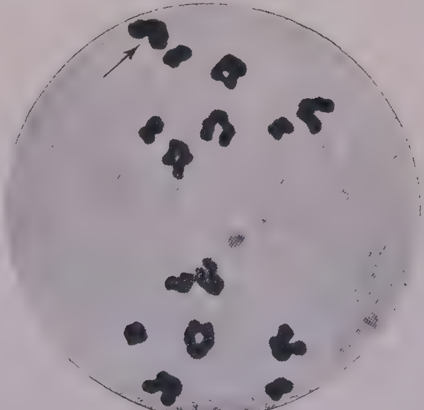
11



8



10



9

PLANCHE VI

Plante A

Fig. 1. — Moitié d'une anaphase I montrant le chromosome surnuméraire (flèche) sous la forme d'un V largement ouvert et inclus dans le groupe polaire. Remarquer l'enroulement montré par chacun des chromatides et que ceux-ci sont reliés par le centromère. Confronter avec la fig. text. 15.

Fig. 2. — Anaphase I. Stade de déroulement des chromatides du chromosome surnuméraire (flèche) plus avancé que celui montré par la figure précédente. Les chromatides continuent à être reliés par le centromère.

Fig. 3. — Télophase I. Le chromosome surnuméraire a été inclus dans un des noyaux. Remarquer que le déroulement des chromatides ne s'est pas défait et qu'ils sont reliés par le centromère, qui ne s'est pas clivé. Remarquer aussi le degré de compacité du chromosome surnuméraire.

Figs. 4 et 5. — Formation de fuseaux tripolaires. Le chromosome surnuméraire (flèches), placé dans le plan équatorial de son fuseau, est sur le point de se séparer en deux chromatides. Confronter avec les figs. text. 16*a* et *b*.

Fig. 6. — Le chromosome surnuméraire a édifié un fuseau indépendant, où il s'est divisé en deux chromatides (flèche). Confronter avec la fig. text. 17*a*.

Figs. 7 et 8. — Photographies de la même anaphase I montrant que le chromosome surnuméraire a engendré un fuseau indépendant, où il s'est clivé. Les deux chromatides (flèches) se dirigent vers les pôles respectifs. Sur la fig. 8, on peut discerner l'enroulement des chromatides. Confronter avec la fig. text. 17*b*.

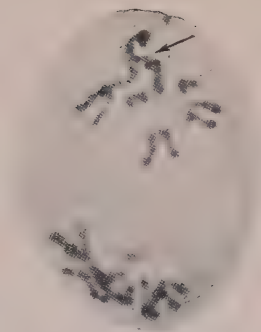
Fig. 9. — Le chromosome surnuméraire, localisé entre un des pôles et la membrane cellulaire, a engendré un fuseau, dont un des pôles est le pôle du fuseau principal le plus voisin du chromosome et l'autre est un pôle indépendant. Le chromosome s'est séparé en deux chromatides (flèches), dont l'un sera inclus dans le groupe polaire, tandis que l'autre émigrera vers l'autre pôle, où il deviendra un micronoyau. Confronter avec la fig. text. 18.

Figs. 10-12. — Télophases I. Le chromosome a été rejeté dans le cytoplasme, où il a été converti en un micronoyau. Remarquer que le micronoyau de la fig. 12 présente une structure comparable à celle des noyaux principaux et que les micronoyaux des figures 10 et 11 présentent un chromocentre.

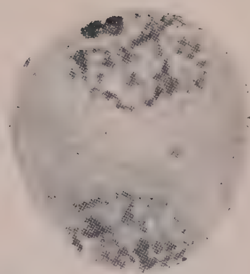
× 850.



1



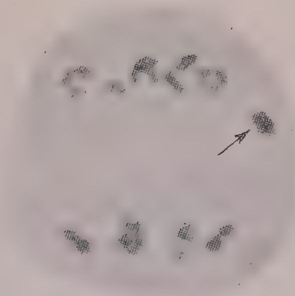
2



3



4



5



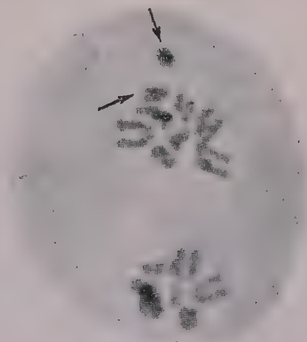
6



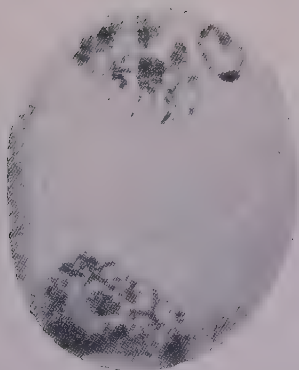
7



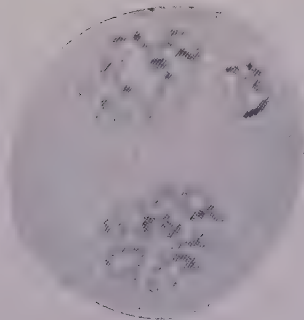
8



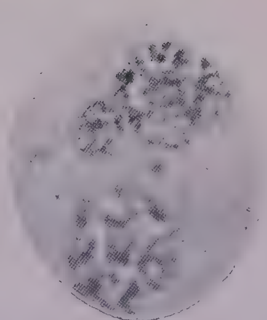
9



10



11



12

PLANCHE VII

Plante B

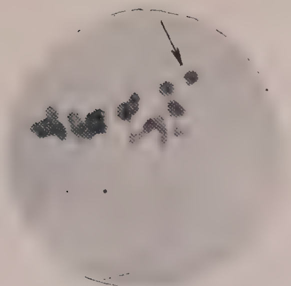
Figs. 1-3. — Métaphases I montrant 7 bivalents et les chromosomes surnuméraires accouplés avec eux-mêmes.

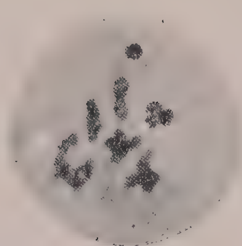
Figs. 4-8. — Stades successifs de la séparation des chromatides du chromosome surnuméraire. Les chromatides ne se sont pas déroulés.

Fig. 9. — Télophase I. Les deux chromatides n'ont pas réussi à gagner les pôles avant la télophase. Ils ont été rejetés dans le cytoplasme, où ils sont devenus des micronoyaux (flèches).

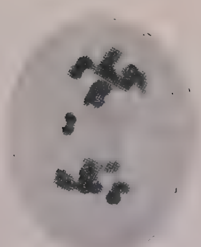
Figs. 10-12. — Anaphases I. Séparation des duex chromatides du chromosome surnuméraire accompagnée du déroulement des chromatides.

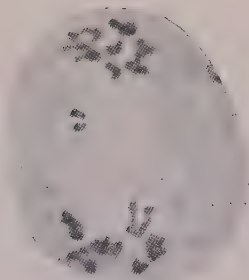
× **850.**

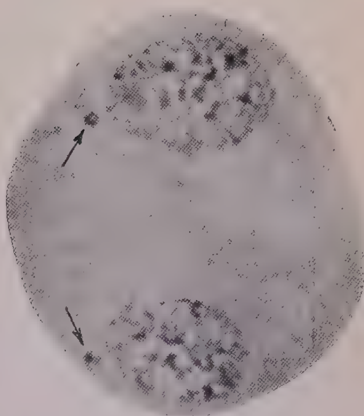

1


2

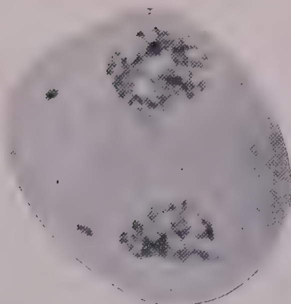

3

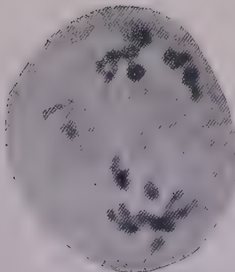

4

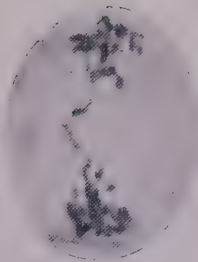

5

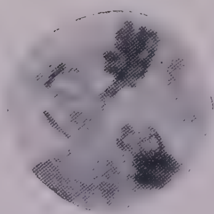

9


7


8


10


11


12

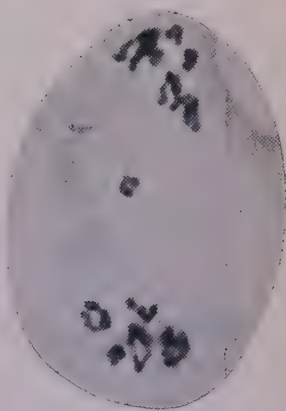

6

PLANCHE VIII

Plante B

Fig. 1. — Les chromatides (flèches) du chromosome surnuméraire ont réussi, malgré le retard, à être inclus dans les groupes polaires.

Fig. 2. — Anaphase I. Le chromosome surnuméraire (flèche) est localisé au voisinage d'un des pôles.

Fig. 3. — Télophase I. La flèche indique le chromosome surnuméraire, dont la compacité est à remarquer, inclus dans un des noyaux.

Figs. 4 et 5. — Les chromatides, attachés par les extrémités distales, montrent des difficultés de séparation.

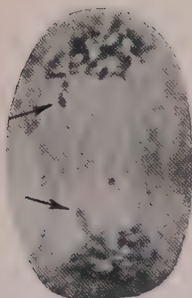
Fig. 6. — Télophase I. Conformation qui pourrait avoir été engendrée par suite d'un pont.

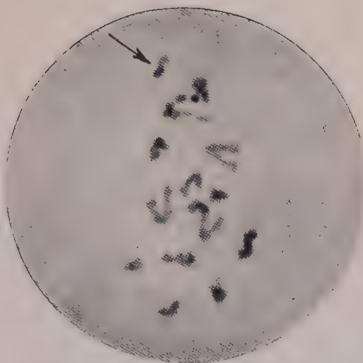
Fig. 7. — Télophase I montrant deux micronoyaux (flèches).

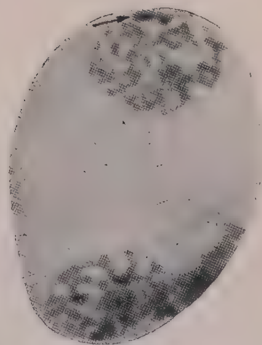
Fig. 8. — Télophase I montrant aussi deux micronoyaux, dont la compacité est plus grande que celle des micronoyaux de la figure précédente.

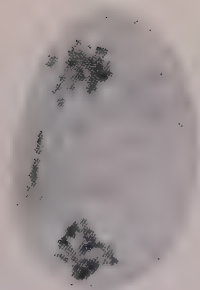
Fig. 9. — Noyau d'un microspore montrant un chromocentre (flèche) compact, correspondant au chromosome surnuméraire.

×850.

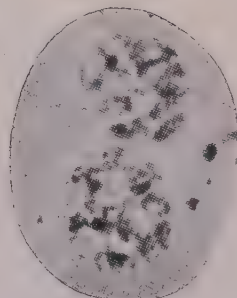

1

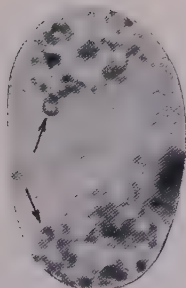

2

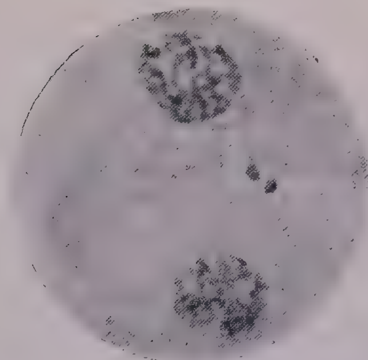

3

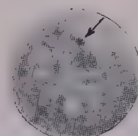

4


5


6


7


8


9

DIE TANNIN-EISEN — III — METHODE UND DIE MIKROSKOPISCHE STRUKTUR DER CHLOROPLASTEN

von

M. C. DE REZENDE-PINTO (1)

EINLEITUNG

Es war HEITZ (1932), dem es zuerst gelang, die Struktur der Chloroplasten mikrophotographisch aufzunehmen: sie bestehen aus einem farblosen Stroma, in das die Chlorophyllplättchen eingebettet sind. Diese besondere Struktur hielt ihren Einzug in die botanische Literatur unter der Bezeichnung Granastruktur (SCHIMPER, 1885).

Zu ihrer Beobachtung in lebendem Zustande habe auch ich mit ausgezeichneten Ergebnissen rotes Licht angewendet (vgl. DOUTRELIGNE, 1935).

Es ist mir nicht bekannt, dass bis heute irgend eine Färbungsmethode gefunden worden wäre, die diese Struktur mit der Deutlichkeit und Eigentümlichkeit gezeigt hätte wie meine Färbungsmethode (REZENDE-PINTO, 1946). Durch ihre Anwendung gelingt es, die Struktur der Chloroplasten in vorher fixiertem und in Paraffin eingeschlossenem Material zu beobachten.

MATERIAL UND METHODEN

Das für meine Beobachtungen ausgewählte Material waren: Blätter von *Mnium affine* Bland. und Blattabschnitte von *Trichomanes radicans* Sw., ein Material, das wirklich ausgezeichnet ist durch die Tatsache, dass die zwischen den Nerven liegende Blattfäche aus nur einer

(1) Stipendiat des « Instituto para a Alta Cultura » im « Centro de Ciências Naturais » der Universität Porto.

Zellschicht besteht, was ein unentbehrliches Erfordernis bei Beobachtungen am lebenden Objekt ist.

Um die Eigentümlichkeit dieser Färbungsmethode und die vollkommene Übereinstimmung der Ergebnisse am lebenden Objekt und nach der Fixierung und Einschliessung zeigen zu können, verfuhr ich auf folgende Weise:

1. *Beobachtung der Chloroplastenstruktur am lebenden Objekt*

Die Blätter von *Mnium affine* Bland., und die Blattabschnitte von *Trichomanes radicans* Sw. wurden zwischen Objektträger und Deckglas in einen Wassertropfen gebracht und sogleich im roten Licht beobachtet und mikrophotographiert (Taf. I, Abb. 1 u. 3).

2. *Beobachtung der Chloroplastenstruktur an endgültigen Präparaten.*

Die Blätter von *Mnium affine* Bland. und die Blattabschnitte von *Trichomanes radicans* Sw., wurden fixiert in *Acetoforsaldicr.* (5 % ige Essigsäure, 24 Stunden; Gemisch von 10 % igem Formalin mit 3 % igem Natriumchlorid, 48 Stunden; Waschung in fliessendem Wasser, 24 Stunden; 3 % iges Kaliumbichromat, 3-6 Tage), einen Tag lang in fliessendem Wasser gewaschen, dehydriert und in Paraffin eingeschlossen. Die Schnitte von 5 μ wurden aufgeklebt, entparaffiniert, in destilliertem Wasser gewaschen und mit Tannin-Eisen — III (REZENDE-PINTO, 1946 a, 1946 b) gefärbt.

Es scheint mir nicht überflüssig, zu betonen, dass der gute Erfolg der Färbung zum grossen Teil von der Zeit der Hydrolyse in ClH 1/N abhängt, die in gewisser Weise im Zusammenhang mit dem Alter der Plastiden steht, und zwar muss sie verkürzt oder verlängert werden, je nachdem die Plastiden mehr oder weniger alt sind.

Ohne sie zeigen die erwachsenen Plastiden ein sehr labiles Verhalten, aber immer mit hypotannophilen Kennzeichen (vgl. SALAZAR, 1943).

Andererseits hat die Fixierung eine hervorragende Bedeutung nicht nur in Bezug auf die Konservierung der Struktur der Plastiden, sondern auch weil von ihr die Färbung abhängt (vgl. Rezende-Pinto, 1946b).

BEMERKUNGEN

Die Gegenüberstellung der Mikrophotographien der Chloroplasten in lebendem Zustande (Taf. I, Abb. 1 u. 3) von *Trichomanes radicans* Sw. bzw. *Mnium affine* Bland., mit denen desselben fixierten und mit *Tannin-Eisen — III* gefärbten Materials (Taf. I, Abb. 2 u. 4) ist mehr als ausreichend, um die Vorzüge der vorliegenden Technik zur Verdeutlichung der Chloroplastenstruktur zu beweisen. Während das Stroma im allgemeinen eine hellgraue Farbe zeigt, Hypotannophilie, erscheinen die Plättchen der Chloroplasten intensiv schwarz oder blauschwarz, sekundäre Tannophilie.

Dass diese Färbung in keiner Weise auf der Anwesenheit von Chlorophyll in den Chlorophyllscheiben beruht, ist leicht zu zeigen; es genügt, daran zu erinnern, dass dieses Pigment während der Behandlungen, denen das Material bis zum Augenblick der Färbung unterworfen ist, mit Leichtigkeit entfernt wird. Andererseits zeigt sich diese Struktur in analoger Weise in anderen Arten von Plastiden, deren Aufbauplan, wie ich in einer andern Arbeit Gelegenheit haben werde zu zeigen, genau analog ist.

Unter diesen Umständen muss sie vielmehr mit dem besonderen Aufbau der Proteine der Scheiben in Zusammenhang stehen, die nach der Hydrolyse die Eigenschaft erwerben, mit der *Tannin-Essigsäure von* Salazar einen Tanno-Protein-Komplex zu bilden, der in Verbindung mit dem Eisen das schwarze Eisentannat ergibt.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERGEBNISSE

Die Scheiben der Chloroplasten, wie auch die anderen Arten von Plastiden in vorher zweckentsprechend fixiertem, in Paraffin eingeschlossenem usw. Material zeigen

eine vollkommene sekundäre Tannophilie, die es erlaubt, sie mit Deutlichkeit inmitten des hypotannophilen Stromas zu unterscheiden. Diese sekundäre Tannophilie entwickelt sich nur nach einer angemessenen Hydrolyse in ClH 1/N.

Sie beruht nicht auf der Anwesenheit von Chlorophyll in den Scheiben, sondern auf den Proteinen, die sie bilden.

LITERATUR

DOUTRELIGNE, J.

1935 *Proc. Ac. Amsterdam, 38. 886* (nach FREY-WYSSLING, 1938).

FREY-WYSSLING, A.

1939 Submikroskopisch Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate, Berlin.

HEITZ, E.

1932 *Planta, 18, 616* (nach FREY-WYSSLING, 1938).

REZENDE-PINTO, M. C. de

1946a A new cytological technics, the Tannin-iron-III. *(sent for publication in Stain Technology).*

1946b Articulation du Tannin-fer-III avec la méthode de Feulgen-Rossenbeck. *Anais da Faculdade de Ciências do Porto, XXXI, Fasc. 2.º.*

SALAZAR, A. L.

1943 Sur la question Chondriome et Plastidome. *Anat. Anz., Bd. 94, S. 225--288, Jena.*

SCHIMPER, A. F. W.

1885 Untersuchungen über die Chlorophyllkörper und die ihnen homologen Gebilde. Jahrb. f. wiss. Bot., 16 : 1-246.

ERKLÄRUNG DER TAFEL

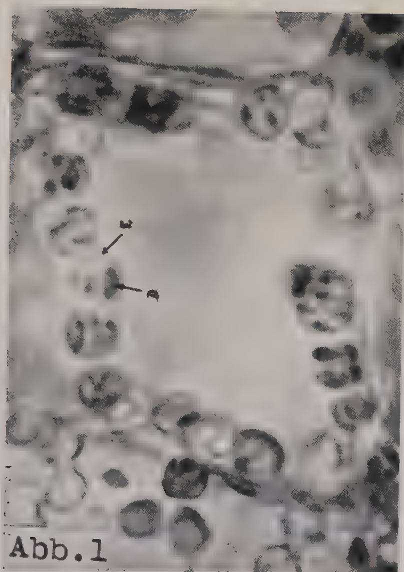
TAFEL I

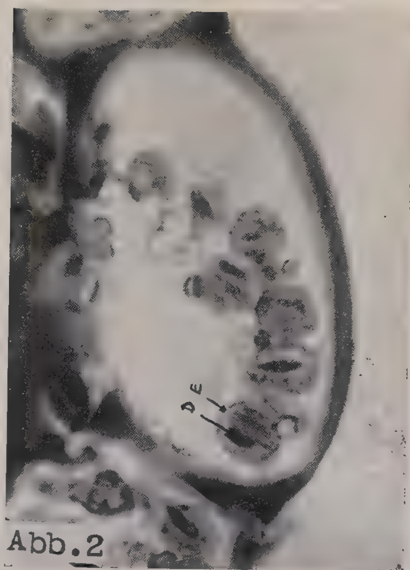
Abb. 1. — *Trichomanes radicans* Sw.
Chloroplasten lebend in rotem Licht mikrophotographiert; E -- Stroma, D — Chlorophyllscheiben. X 2.056.

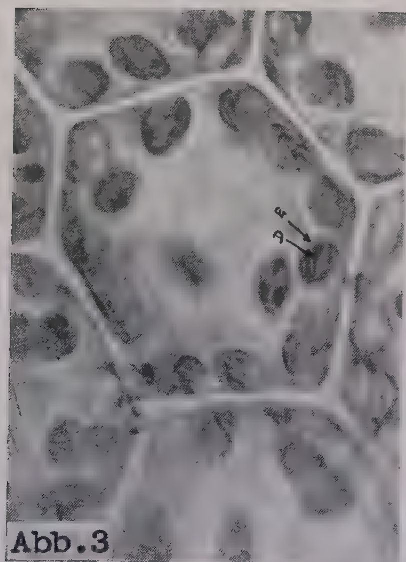
Abb. 2. — *Trichomanes radicans* Sw.
Chloroplasten in einem Querschnitt des Blattes gesehen; E — Stroma, D — Chlorophyllscheiben. Acetoforsaldicr.; Tannin-Eisen — III. X 2.056.

Abb. 3. — *Mnium affine* Bland.
Chloroplasten lebend in rotem Licht mikrophotographiert; E — Stroma, D — Chlorophyllscheiben. X 1.208.

Abb. 4. — *Mnium affine* Bland.
Chloroplasten in einem Querschnitt des Blattes gesehen; E — Stroma, D — Chlorophyllscheiben. Acetoforsaldicr.; Tannin-Eisen — III. X 1.208


Abb.1


D E
Abb.2


D E
Abb.3


D E
Abb.4

FENOMENOS DE ANTIBIOSE ENTRE FUNGOS *

OBSERVAÇÕES DE CULTURAS EM MEIOS SÓLIDOS

por

MANUEL FERREIRA e A. LIMA CARNEIRO

Instituto de Botânica Dr. Gonçalo Sampaio. Director Prof. A. Pires de Lima.
Faculdade de Ciências do Porto.

ESTA comunicação é fundamentalmente uma hipótese de trabalho, todavia já se afirmam alguns factos observados e deles se apresentam as conclusões correspondentes. Entre os modernos problemas da biologia, os que respeitam ao metabolismo material e energético são dos mais árduos e apaixonantes; e só nos últimos anos o seu mecanismo começou a interpretar-se e a analisar-se a extensão dos processos.

O conceito da acção catalítica foi ràpidamente utilizado nestes estudos bioquímicos e um capítulo imenso surgiu a ocupar-se dos sistemas fermentativos e dos factores de crescimento.

Apurou-se a constituição química de muitos desses sistemas, a constituição e a ligação de várias cadeias enzimáticas e viu-se como certos metais e algumas vitaminas actuavam, sendo co-enzimas ou deles formando a sua parte activa.

Os processos de nutrição exercendo-se por séries de reacções bioquímicas, desvios ou distúrbios nessas reacções podem provocar-se, quer empregando factores físicos e químicos impróprios, quer fazendo o bloqueio dos enzimas por substâncias quìmicamente afins dos seus co-enzimas ou inibindo a utilização dos elementos essenciais.

---

* Comunicação apresentada nas comemorações do II centenário do nascimento de BROTERO (Coimbra, 23-26 de Novembro de 1944).

Os seres inferiores, designadamente os heterotróficos, no meio em que vivem, podem deparar com esses elementos físicos e químicos que lhes pertubam as suas funções e ainda e sobretudo com condições biológicas derivadas da presença de outros organismos heterotróficos que lhes podem ser favoráveis ou prejudicais; e estas condições antagónicas, de competição, dependem de modificações químicas do ambiente, de produtos de excreção, da acção de enzimas, ou dos factores termo-estáveis e dializáveis, as vitaminas.

Entre estas, se com algumas há sinergismo, com outras dão-se acções opostas.

É velho o conhecimento da concorrência vital e já em 1877 Pasteur assinalara, pela primera vez, a antibiose microbiana, mas foi em 1928 que Fleming, o abençoado investigador, de «mente preparada» viu e apercebeu o transcendente fenómeno antibiótico produzido pelo *Penicillium notatum.*

Um novo campo imenso de investigações se abriu e desenrolou e por toda a parte se promovem e analisam fenómenos de competência entre microorganismos; e este novo ramo adentro da biologia apresenta-se promissor de fecundos resultados e farta colheita e até a esperança se entrevê de encontrarem-se inibidores para todas as formas de parasitas.

Conhecem-se e isolaram-se já vários antibióticos e de alguns a sua natureza química foi determinada, como a gramicidina e tirocidina que são polipeptídeos, a piocinase um enzima, a penatina um pigmento e a canavalina a mistura de um enzima e um co-enzima.

Se exceptuarmos a clorelina obtida de duas algas, a *Chlorella vulgaris* e a *Chlorella pyrenoidosa* e a alicina do *Allium sativum* Lin., os agentes antibióticos provêm de seres heterotróficos e, segundo Waksman e Woodruff, actualmente podem apenas classificar-se consoante a sua origem. Distribuem-se por três grupos: o primeiro, constituido por antibióticos de fonte bacteriana, como a gramicidina e a tirocidina, produzidos pelo *Bacillus brevis*, o

segundo pelos derivados de actinomicetes como a estreptotricina e a estreptomicina e o mais importante pelos que se originam de deuteromicetes, de algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*; pertence a este grupo o antibiótico maravilhoso que é a penicilina.

Ora, no mundo imenso dos microorganismos um lugar de relêvo ocupa a família das *Saccharomycetaceæ*, classe *Eumycete*.

Profundos trabalhos de investigação têm sido realizados sobre as leveduras, desde o genial PASTEUR sobre a fermentação até os modernos estudos de enzimologia. Múltiplas vitaminas contêm as leveduras, ricas em tiamina e nos elementos do complexo B2, muitos dos quais factores activos de co-enzimas; e para a maior parte dessas vitaminas são as leveduras auxo-autotróficas, quer dizer, fazem a sua síntese com os componetes do meio.

Meditando na sua extraordinária actividade biológica, na sua exigência de constelações de factores de crescimento, alguns ainda não identificados e igualmente necessários para outros fungos e bactérias, como diz SCHOPFER, e também nas considerações, que à guiza de modesto preâmbulo a esta comunicação se escrevera, foi que um de nós (M. F.) pensou em fazer observações utilizando as leveduras com a esperança de provocar fenómenos de antibiose.

Pois, porque não experimentar com este fungos, quando isso se tem feito com tantos outros?

LIMA CARNEIRO, que desde há muito se tem dedicado com o maior interesse ao estudo das micoses humanas, tinha isolado em cultura pura duas espécies, agentes de tinhas e outras afecções humanas, o *Trichophyton crateriforme* Sab. e o *Trichophyton violaceum* Bod.; com estas duas espécias começamos e continuamos o nosso trabalho e escolhemo-las por se tratar de parasitas com organização superior à das bactérias, com as células das suas hifas possuindo uma membrana própria, bem diferenciada.

De *Saccharomycetaceæ*, como antagonistas, empregamos 4 espécies: *Saccharomyces granulatus* Vuil., *Sccharomyces cerevisiae* Han., uma levedura vermelha. rica em carotinóides e variedade nova para a ciência, *Rhodotorula*

glutinis var. *lusitanica* (1) (MARCILLA, FEDUCHY, MARQUES GOMES) e uma levedura inquinada de bactérias e ainda não classificada, que se designa por *Saccharomyces «X»*.

As observações feitas com *Saccharomyces* «X» apresentam-se a título de curiosidade e em confirmação do problema geral.

É já bastante extenso o protocolo das nossas observações; as primeiras fizeram-se, semeando em tubos com meio de Sabouraud as duas espécies de *Trichophyton* atrás referidas e utilizando como antagonista *Rhodotorula glutinis* var. *lusitanica*. Apresentamos apenas os resultados verificados com o *Trichophyton crateriforme* Sab., porquanto os obtidos com *Trichophyton violaceum* Bod., são concordantes. A temperatura a que se desenvolveram, foi a do ambiente, tendo as observações registadas sido feitas desde Maio a Outubro de 1944.

Primeira observação (Est. I, fig. 1) — Repicagem em 18/v/944:

a) — cultura testemunha, em meio de Sabouraud, de *Trichophyton crateriforme* Sab. em 10/vi/944, com as dimensões de $4{,}5 \times 2{,}5$ cm.;

b) — cultura de *Trichophyton crateriforme* Sab., com *Rhodotorula glutinis* var. *lusitanica*, as suas dimensões são $2 \times 1{,}5$ cm..

Segunda observação (Est. I, fig. 2) — Semeadura em 18/v/944, em meio Sabouraud, mas desta vez em dois pontos, com o *Trichophyton crateri-*

---

(1) Esta levedura selvagem, que cultivamos e isolamos, enviámo-la ao Prof. D. JUAN MARCILLA, director do Instituto Ramon y Cajal, de Madrid, com o pedido do seu estudo e classificação. O Prof. Dr. J. MARCILLA, tendo como colaboradores o Prof. FEDUCHY e o engenheiro agrónomo português, MARQUES GOMES, concluiu ser a levedura uma variedade nova de *Rhodotorula glutinis*, que designou *lusitanica*, em homenagem à nossa Pátria.

Ao Prof. D. J. MARCILLA, ao Prof. FEDUCHY e ao engenheiro MARQUES GOMES, consignamos o nosso profundo reconhecimento e protestamos-lhe toda a nossa consideração.

forme Sab., tanto no tubo testemunha como no tubo com *Rhodotorula glutinis* var. *lusitanica*, que foi semeada num ponto na parte superior do tubo:

a) — as semeaduras testemunhas em 10/VI/944 com as dimensões de 2×1 cm. e de 3,2×1,5 cm.;

b) — no meio com *Rhodotorula glutinis* var. *lusitanica*, as dimensões do *Trichophyton crateriforme* Sab., respectivamente de 7×7 mm. e de 2 cm.×8 mm..

Terceira observação (Est. I, fig. 3) — Repicagens em em 18/V/944, meio Sabouraud, simples no tubo testemunha, no outro tubo, dupla de *Rhodotorula glutinis* var. *lusitanica* e simples de *Trichophyton crateriforme* Sab.:

a) — cultura testemunha em 10/VI/944 com as dimensões de 4,3×1,5 cm.;

b) — as dimensões do *Trichophyton crateriforme* Sab., no meio com a levedura vermelha, 7×6 mm..

Quarta observação (Est. II, fig. 1) — Passou a utilizar-se como antagonista *Saccharomyces cerevisiae* Han.. Repicagens em 23/V/944:

a) — no tubo testemunha, meio Sabouraud, em 15/VI/1944 o *Trichophyton crateriforme* Sab. amplamente desenvolvido;

b) — no outro tubo, duas semeaduras de *Saccharomyces cerevisiae* Han. e, entre elas, uma de *Trichophyton crateriforme* Sab., de que se notou apenas um ponto branco.

Quinta observação (Est. II, fig. 2) — Repicagens em 1/VI/944:

a) — cultura testemunha de *Trichophyton crateriforme* Sab. dupla, em meio Sabouraud com as dimensões de 6×5 mm. e 9×9 mm.;

b) — as culturas de *Trichophytoncra teriforme* Sab., reduzidas a dois pontos brancos, desenvolvendo-se o *Saccharomyces cerevisiae* Han. no intervalo e tendo-se disseminado pelo meio.

Sexta observação (Est. II, fig. 3) — Transplante em 16/IX/944, em meio Sabouraud, descrevendo-se já a observação por se tratar de *Saccharomyces cerevisiae* Han. como antagonista:

a) — o *Trichophyton crateriforme* Sab. em estado pleomórfico enche o tubo;

b) — *Saccharomyces cerevisiae* Han., pequena cultura a meio do tubo, bloqueia o desenvolvimento do *Trichophyton crateriforme* Sab..

Sétima observação (Est. III) — Repicagens em placas de Petri, meio Sabouraud, em 20/VI/944:

a) — *Trichophyton crateriforme* Sab. na placa testemunha, em 3/VII/944, de forma esférica, com o diâmetro de 3,3 cm.;

b) — *Saccharomyces cerevisiae* Han., com amplo desenvolvimento, e o *Trichophyton crateriforme* Sab., com o diâmetro de 7 mm..

Ao relatarmos o forte antagonismo do *Saccharomyces cerevisiae* Han., com o *Trichophyton crateriforme* Sab., devemos confessar a nossa surprêsa e ainda o nosso estado de dúvida; possìvelmente interveio qualquer causa de êrro, precisando de serem repetidas as observações.

Com outra levedura, que isolamos, *Saccharomyces granulatus* Vuil., fizemos também observações, mas os resultados foram negativos, nenhum fenómeno antibiótico se verificou.

Durante as férias, um de nós (M. F.) prosseguiu interessado com o trabalho; e os meios de cultura usados foram o de Sabouraud, de agar-mosto de cerveja, e de agar-batata, enquanto que nas experiências anteriores empregou-se sòmente o meio de Sabouraud.

Apresenta-se uma segunda série de documentos, mas desta feita, não se dão as dimensões das culturas, a sua visão fotográfica é suficiente. É conhecida a facilidade com que os meios em placa de Petri se inquinam; essa facilidade fez com que se pudesse isolar outra espécie de levedura selvagem, embora inquinada de bactérias, que designamos por *Saccharomyces* «X».

Pelas repicagens sucessivas de *Trichophyton crateriforme* Sab., da mesma estirpe, deu-se a transformação macroscópica das culturas, o que é frequente nestes fungos, ainda que não perdem a sua virulência; como o que interessava eram os fenómenos antibióticos, da forma pleomórfica me fui servindo. Fizeram-se muitas culturas em tubos e placas de Petri com meio de Sabouraud, agar-mosto de cerveja, e agar-batata; apresentamos apenas algumas fotografias feitas quando as culturas tinham 20 dias de desenvolvimento.

Oitava observação (Est. IV) — *Semeadura* em 11/XI/944:

a) — placa de Petri com cultura testemunha, em meio agar-mosto de cerveja, de *Trichophyton crateriforme* Sab., em estado pleomórfico, que a enche totalmente;

b) — cultura de *Trichophyton crateriforme* Sab., bloqueada por *Saccharomyces* «X»;

c) — cultura de *Trichophyton crateriforme* Sab., e *Rhodotorula glutinis* var. *lusitanica*, com fenómenos de antibiose patentes.

Nona observação (Est. V, fig. 1) — Repicagens em 30/XI/944:

a) — tubo testemunha de *Trichophyton crateriforme* Sab., em meio agar-mosto de cerveja;

b) — cultura de *Trichophyton crateriforme* Sab., e de *Saccharomyces* «X», encontrando-se o *Trichophyton crateriforme* Sab., na extremidade inferior do tubo bloqueado no seu desenvolvimento.

Décima e undécima observações (Est. V, figs. 2 e 3) —Repicagens em 30/xi/944: repetição da experiência anterior, sendo desta vez o *Saccharomyces* «X» semeado na extremidade inferior do tubo.

Duodécima observação (Est. VI, fig. 1) — Semeadura em 5/x/944:

a) — *Trichophyton crateriforme* Sab. em meio Sabouraud, enchendo o tubo;

b e b') — *Saccharomyces* «X» na extremidade inferior inibindo o crescimento do *Trichophyton crateriforme* Sab.

Décima terceira observação (Est. VI, fig. 2) — Repicagens em 5/x/944:

a) — *Trichophyton crateriforme* Sab. no tubo testemunha, com meio agar-mosto de cerveja;

b) — semeadura de *Thrichophyton crateriforme* Sab. em dois pontos marcados pelas elavações mamilares e de *Saccharomyces* «X» na extremidade inferior; nota-se a antibiose produzida sobre a cultura vizinha de *Trichophyton crateriforme* Sab., cujo desenvolvimento se deu para o lado oposto.

Com estas observações e várias outras que se fizeram documentam-se fenómenos de antibiose produzidos pelas duas leveduras selvagens que encontramos, *Rhodotorula glutinis* var. *lusitanica* e *Saccharomyces* «X», inquinada, e, ainda por *Saccharomyces cerevisiae* Han.; *Saccharomyces granulatus* mostrou-se inactivo. Todas as observações referem-se a culturas em meio sólido, onde a antibiose é lenta e menos fácil; esperamos continuar, fazendo também a cultura das leveduras selvagens em meios líquidos e utilizando depois os filtrados em concorrência com os mais diversos microorganismos.

EXPLICAÇÃO DAS ESTAMPAS

ESTAMPA I

Fig. 1. a) — *Trichophyton crateriforme* Sab., cultura em meio Sabouraud, testemunha.

b) — *Trichophyton crateriforme* Sab., em cultura simultânea com *Rhodotorula glutinis* var *lusitanica*, meio Sabouraud.

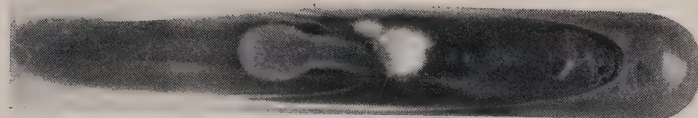
Fig. 2. a) — *Trichophyton crateriforme* Sab., dupla repicagem, tubo testemunha com meio Sabouraud.

b) — *Trichophyton crateriforme* Sab., dupla repicagem, em cultura com *Rhodotorula glutinis* var. *lusitanica*, repicagem simples, meio Sabouraud.

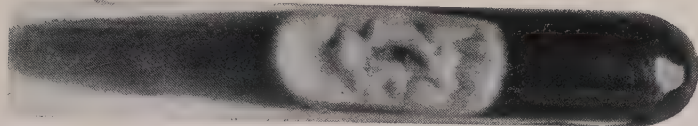
Fig. 3. a) — *Trichophyton crateriforme* Sab., semeadura simples, meio Sabouraud.

b) — *Trichophyton crateriforme* Sab., semeadura simples entre *Rhodotorula glutinis* var. *lusitanica* em semeadura dupla.

Estampa I

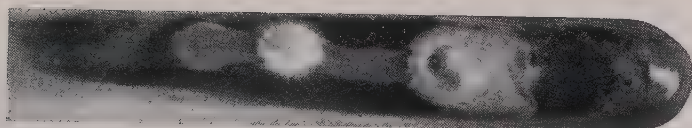


b



a

Fig. 3



b

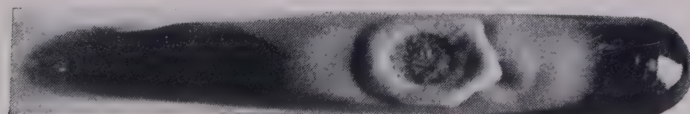


a

Fig. 2



b



a

Fig. 1

ESTAMPA II

Fig. 1. a) — *Trichophyton crateriforme* Sab., cultura simples, meio Sabouraud.

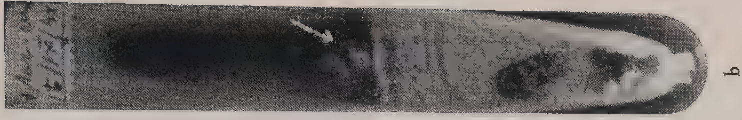
b) — *Trichophyton crateriforme* Sab., reduzida a um ponto branco, e *Saccharomyces cerevisiae* Han., repicagem na parte média do tubo, tendo-se dispersado pela extremidade inferior.

Fig. 2. a) — *Trichophyton crateriforme* Sab., em repicagem dupla.

b) — *Trichophyton crateriforme* Sab., repicagem dupla com o desenvolvimento reduzido a dois pontos brancos bem visíveis, e *Saccharomyces cerevisae* Han., repicagem feita entre as do *Trichophyton crateriforme* Sab., que difundiu pelo meio.

Fig. 3. a) — *Trichophyton crateriforme* Sab., em estado pleomórfico, enchendo o tubo, em meio Sabouraud.

b) — *Trichophyton crateriforme* Sab., bloqueado por *Saccharomyces cerevisiae* Han., semeado na parte média do tubo.


b

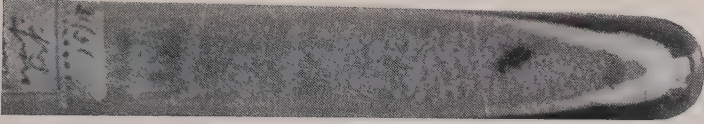
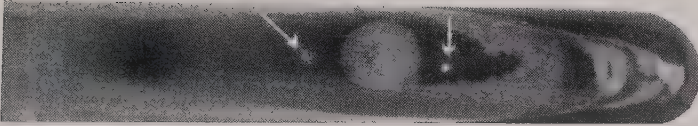

a

Fig. 3


b

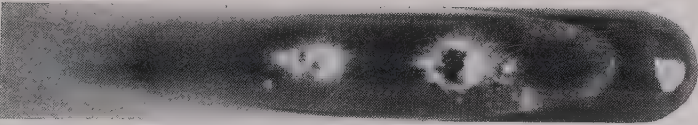
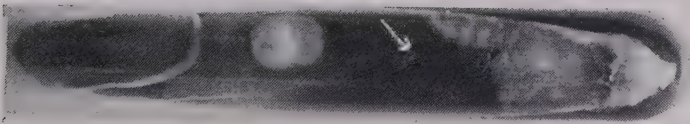

a

Fig. 2


b

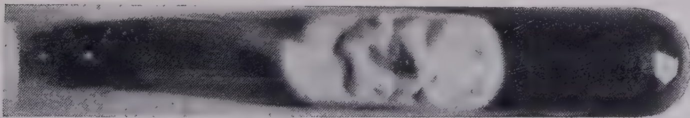
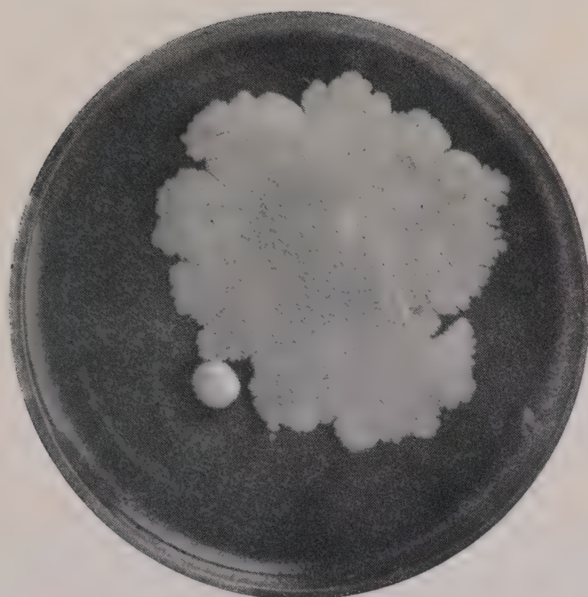

a

Fig. 1

ESTAMPA III

a) — *Trichophyton crateriforme* Sab.. cultura testemunhr em placa de Petri com o diâmetro de 3,3 cm., meio Sabouraud.

b) — *Trichophyton crateriforme* Sab., cultura com o diâmetro de 7 mm., e *Saccharomyces cerevisiae* Han., de amrlo desenvolvimento, em meio Sabouraud.



a



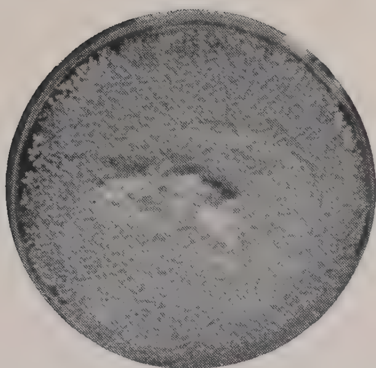
b

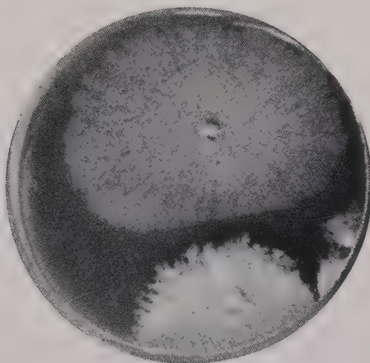
ESTAMPA IV

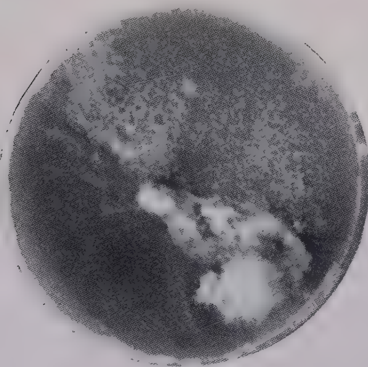
a) — *Trichophyton crateriforme* Sab., em estado pleomórfico, cultura em meio agar-mosto de cerveja, enchendo totalmente a placa de Petri.

b) — *Trichophyton crateriforme* Sab., e *Saccharomyces* «X», em meio agar-mosto de cerveja.

c) – *Rhodotorula glutinis* var. *lusitrnica* e *Trichophyton crateriforme* Sab., no mesmo meio ; fenómenos de antibiose marcados em *b* e *c*.


a


b


c

ESTAMPA V

Fig. 1. a) — *Trichophyton crateriforme*, Sab., em estado pleomórfico em agar-mosto de cerveja.

b) — *Trichophyton crateriforme* Sab., semeadura na extremidade inferior do tubo, onde se encontra bloqueado por *Saccharomyces* «X».

Fig. 2. a) — *Trichophyton crateriforme* Sab., em agar-mosto de cerveja.

b) — *Trichophyton crateriforme* Sab., em agar-mosto de cerveja e *Saccharomyces* «X», semeadura na extremidade inferior do tubo.

Fig. 3. a e b — Repetição da observação anterior.

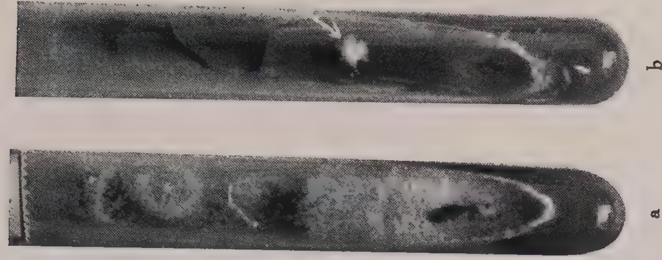


Fig. 3

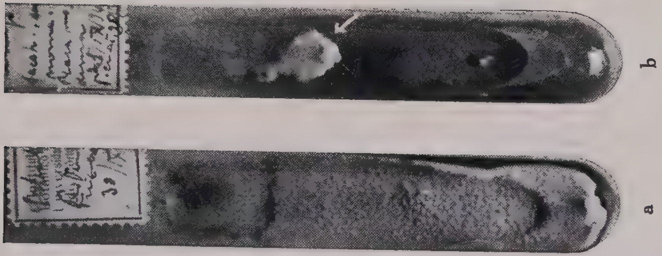


Fig. 2

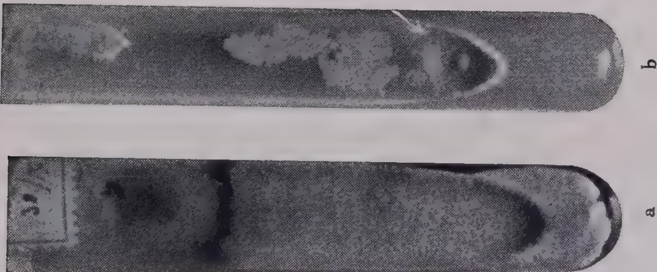


Fig. 1

ESTAMPA VI

Fig. 1. a) — *Trichophyton crateriforme* Sab., em meio Sabouraud e estado pleomórfico, enchendo o tubo.

b) e b') — *Trichophyton crateriforme* Sab., meio Sabouraud, interferido por *Saccharomyces* «X».

Fig. 2. a) — *Trichophyton crateriforme* Sab., em meio agar-mosto de cerveja.

b) — *Trichophyton crateriforme* Sab., duas repicagens marcadas pelas elevações mamilares, a inferior bloqueada por *Saccharomyces* «X».

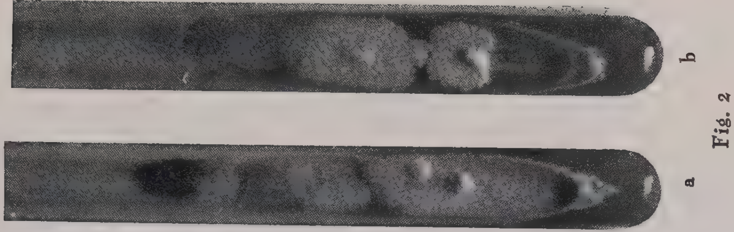


Fig. 2

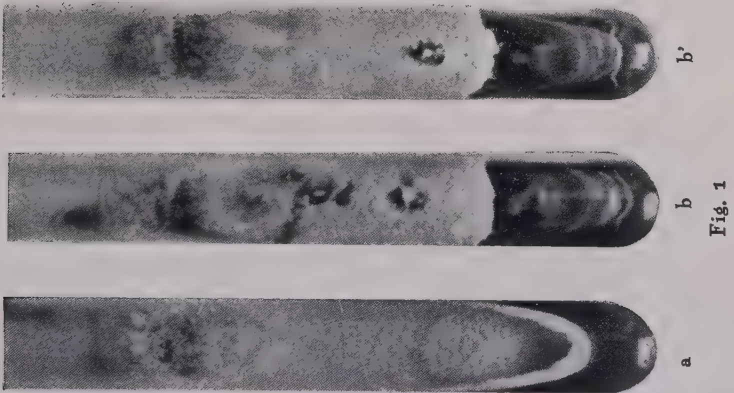


Fig. 1

SUR LE DEVENIR DES MICRONOYAUX FORMÉS À LA MICROSPOROGENÈSE

par

A. FERNANDES

Institut Botanique de l'Université de Coimbra

COMME on le sait, des micronoyaux, correspondant à des chromosomes rejetés dans le cytoplasme, peuvent être engendrés par suite d'anomalies survenues à la méiose des formes hybrides, des formes polyploïdes (surtout celles à degré impair de polyploïdie), des formes polysomiques et parfois même des formes diploïdes. Ces micronoyaux pourront devenir des noyaux de petites cellules, connues sous le nom de microcytes (HOLLINGSHEAD, 1930; CHANDLER, PORTERFIELD et STOUT, 1937; etc.), ou ils peuvent demeurer libres dans le cytoplasme des microspores. L'apparition de ces derniers micronoyaux a été souvent rapportée soit à l'état de tétrade (HOLLINGSHEAD, 1930; BABCOCK et EMSWELLER, 1936; OLMO, 1936; WAKAR, 1936; CHANDLER, PORTERFIELD et STOUT, 1937; FERNANDES, 1937, 1939 *a*; IWATA, 1938; KOSTOFF, 1938; LÖVE, 1944; etc.), soit plus tard, après la séparation des microspores (NAGAO, 1935; OLMO, 1936; WAKAR, 1936; CHANDLER, PORTERFIELD et STOUT, 1937; FERNANDES, 1937; SATINA et BLAKESLEE, 1937; LEVAN, 1939, 1940; etc.).

En ce qui concerne le comportement ultérieur des deux catégories de micronoyaux, il est établi qu'ils dégénèrent, en finissant par être résorbés. Étant donné que, à notre avis, le devenir des micronoyaux demeurant dans le cytoplasme des microspores n'était pas encore suffisamment éclairci, nous avons entrepris des recherches, particulièrement dans le but de savoir si ces micronoyaux pourront ou non être inclus dans les noyaux engendrés par la première division des grains de pollen.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE

Nos observations ont porté particulièrement sur *Narcissus jonquilloides* Willk., espèce qui, par suite de sa constitution (hybride d'une forme tétraploïde de *N. Jonquilla* L. et d'une forme diploïde de *N. gaditanus* Boiss. et Reut.), nous a semblé très adéquate à la résolution du problème envisagé.

Les anthères ont été fixées à l'alcool-acétique (3:1) et au liquide de Navachine (modification de Bruun). Les premières ont été dissociées dans une goutte de carmin-acétique, et les préparations obtenues ont été rendues permanentes par l'emploi de la technique relatée par La Cour (1937). Les deuxièmes ont été incluses dans la paraffine d'après la technique usuelle, et les coupes longitudinales, d'une épaisseur de 20 μ, ont été colorées au violet de gentiane.

Dans le but d'étudier le comportement des micronoyaux vis-à-vis de la réaction nucléaire de Feulgen, nous avons effectué aussi quelques observations chez *N. Tazetta* L. var. *Panizzianus* (Parl.). Les anthères de ce matériel ont été fixées aux liquides de Navachine, Flemming-Benda, La Cour 2BE et alcool-acétique (3:1). Ensuite, elles ont été colorées au Feulgen par l'emploi du «Nukleal-Quetschmethode» de Heitz (1936).

OBSERVATIONS

Comme nous l'avons rapporté dans un travail antérieur (Fernandes, 1939 *a*), *N. jonquilloides* Willk. est un hybride d'une forme tétraploïde de *N. Jonquilla* L. et d'une forme diploïde de *N. gaditanus* Boiss. et Reut. D'accord avec cette constitution, nous avons constaté que, pendant la méiose, le plus souvent, 7 bivalents, correspondant à la garniture diploïde de *N. Jonquilla*, et 7 univalents, correspondant à la garniture haploïde de *N. gaditanus*, se forment. Les bivalents subissent la disjonction habituelle, tandis que les univalents peuvent être inclus dans les

groupes polaires, ou être rejetés dans le cytoplasme, où ils deviennent des micronoyaux.

Les micronoyaux demeurant libres dans le cytoplasme des grains de pollen — les seuls qui retiendront notre attention — ont été identifiés dans les jeunes tétrades (figs. 1-3, Pl. I). Ils peuvent être plus (fig. 3, Pl. I) ou moins (figs. 1 et 2, Pl. I) volumineux, ce qui dépend, évidemment, du fait qu'ils peuvent correspondre à des groupes chromosomiques, à des chromosomes longs, ou bien à des chromosomes courts, et ils présentent une structure comparable à celle des noyaux principaux. Ce fait montre que, dans ces micronoyaux, ont lieu des transformations télophasiques semblables à celles qui ont lieu dans les noyaux principaux.

Les tétrades se désintègrent et les micronoyaux continuent à pouvoir être identifiés dans le cytoplasme des grains de pollen pendant l'intercinèse (figs. 4 et 5, Pl. I). Au début de cette période, les micronoyaux se colorent par le Feulgen, et ils présentent encore une structure comparable à celle observée à l'état de tétrade. Un peu plus tard, on peut remarquer que la chromaticité des micronoyaux devient plus grande, et que cette hyperchromaticité est accompagnée d'une réduction de volume et d'une augmentation de compacité (figs. 4 et 5, Pl. I), phénomènes qui s'accentuent progressivement pendant la première mitose du noyau du grain de pollen. De cette façon, les micronoyaux peuvent présenter, vers la fin de la mitose du noyau principal, soit une structure granulaire (granules se colorant intensivement et apparemment disséminés dans une masse homogène), soit une structure compacte.

L'analyse du pollen nous a montré que 30-40 % des grains sont dégénérés, puisqu'ils sont vides ou présentent un contenu en dégénérescence et ne sont pas susceptibles de subir la première divison. Quelques-uns de ces grains sont petits et d'autres plus volumineux. Les premiers correspondent à des microcytes, tandis que les derniers doivent correspondre à des grains déficients ou déséquilibrés.

Les autres grains (60-70 %) montrent un aspect normal, et, bien qu'ils ne possèdent pas tous la même taille, ils

subissent la première divison, en donnant naissance à une petite cellule lenticulaire (cellule génératrice) et à une cellule volumineuse (cellule végétative). Pendant cette division, une figure d'anaphase (fig. 6, Pl. I) a été trouvée où un micronoyau était localisé au voisinage du pôle du noyau générateur. Ce micronoyau se présentait compact, intensivement coloré par le carmin-acétique et enveloppé par une aire claire, engendrée, probablement, par suite de la sortie de quelques produits vers le cytoplasme. Étant donné la localisation de ce micronoyau, il y aurait beaucoup de probabilités pour qu'il fût inclus dans le groupe polaire qui formerait le noyau générateur.

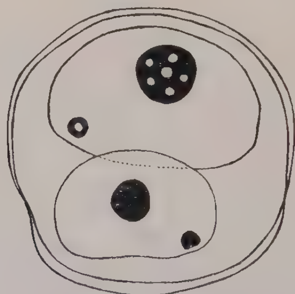


Fig. 1. — *Narcissus jonquilloides* Willk. Grain de pollen montrant un micronoyau inclus dans le noyau générateur et un autre dans le cytoplasme de la cellule végétative (la projection montre ce dernier micronoyau au dedans du contour du noyau végétatif). Remarquer que, tandis que le micronoyau inclus dans le noyau générateur se montre compact, l'autre se présente avec une aire claire centrale, et, par conséquent, dans un état de désintégration plus avancé que le premier. × 1.100

Le fait que les micronoyaux peuvent réellement être inclus dans les noyaux provenant de la première mitose du pollen a été constaté dans les grains bicellulaires, où les micronoyaux présentaient les positions suivantes:

a) *Au dedans du noyau générateur.* — Quelques cas de ce type ont été trouvés. Ainsi, la figure 7, Pl. I, montre un gros micronoyau à structure granulaire, localisé dans la périphérie du noyau générateur. Dans la figure 8, Pl. I, le micronoyau est petit, à peu près réniforme, et sa structure est compacte et homogène (v. aussi fig. text. 1). Dans les

figures 9 et 10, Pl. I, finalement, le micronoyau est encore plus petit et il se présente sphérique, constitué par une région périphérique compacte et une région centrale claire.

b) *Dans le cytoplasme de la cellule génératrice.*—Deux cas de ce type sont montrés dans les figures 11 et 12, Pl. I. Le micronoyau de la figure 11 est petit et compact, tandis que celui de la figure 12 est plus volumineux et présente une structure vacuolaire.

c) *Au dedans du noyau végétatif.* — Ces cas sont plus fréquents que les cas antérieurs, et, pour cette raison, beaucoup de figures ont été trouvées. Nous présentons 4 de ces figures (figs. 1-4, Pl. II), où nous avons constaté, indubitablement, que les micronoyaux se trouvaient au dedans des noyaux.

La position des micronoyaux est variable. Ainsi, ils peuvent se trouver au voisinage du nucléole (fig. 1, Pl. II), plus ou moins écartés de celui-ci (figs. 2 et 4, Pl. II), ou localisés vers la périphérie du noyau (fig. 3, Pl. II). La structure peut être aussi variable: 1) granulaire, c'est-à-dire constituée par des granulations, apparemment disséminées sans ordre dans une masse homogène (fig. 3, Pl. II); 2) compacte, comme de petites boules uniformément colorées (fig. 1, Pl. II); 3) une région périphérique compacte, soit complète, soit incomplète, et une partie centrale plus claire, probablement de nature vacuolaire (figs. 2 et 4, Pl. II); 4) vacuolaire, c'est-à-dire formée par de petites vacuoles disséminées dans une masse homogène (fig. text. 2).

d) *Dans le cytoplasme de la cellule végétative.*—La localisation des micronoyaux est variable et leur structure est comparable à celle que nous venons de décrire pour le cas antérieur, c'est-à-dire: granulaire, compacte (fig. 5, Pl. II), avec une région périphérique compacte, soit complète, soit incomplète, et une autre claire centrale (figs. 6, 7 et 8, Pl. II et figs. 1 et 2, Pl. III) et vacuolaire (figs. 3, 4 et 5, Pl. III). Comme dans l'observation faite à l'anaphase, nous avons constaté que, quelquefois, les micronoyaux se montraient enveloppés par une aire claire (fig. 5, Pl. II et

figs. 2, 5 et 6, Pl. III), engendrée, probablement, par les produits versés dans le cytoplasme. Les micronoyaux à structure vacuolaire continuent encore à se colorer par le Feulgen (fig. 6, Pl. III), mais cette coloration est devenue relativement peu intense et assez comparable à celle présentée par le noyau végétatif.

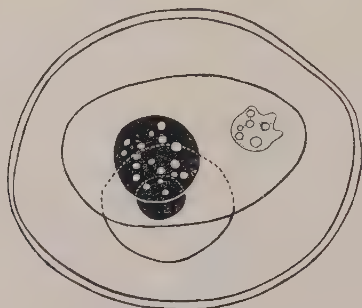


Fig. 2. — *Narcissus jonquilloides* Willk. Grain de pollen montrant un micronoyau à structure vacuolaire inclus dans le noyau végétatif. Carmin-acétique. × 1.100.

Deux grains de pollen bicellulaires ont été trouvés possédant des micronoyaux tout à fait remarquables à cause de leurs grandes dimensions (figs. 7 et 8, Pl. III). La structure de ces micronoyaux était aussi fort remarquable, puisqu'elle ressemblait à celle présentée par les noyaux pendant les premiers stades de la mitose (état dit de «spirème»). Il s'agit, probablement, de micronoyaux engendrés par des groupes de chromosomes et qui ont peut-être réussi à entrer en division, mitose qui aurait été suspendue à cause de la déficience des noyaux.

Malheureusement, les plantes de *N. jonquilloides* que nous possédions ne nous ont fourni, au printemps de cette année, que peu de fleurs, ce qui nous a empêché d'étudier le pollen au moment de la déhiscence des anthères, et de faire les essais de germination, dont nous avions besoin pour éclaircir le devenir des micronoyaux inclus dans le noyau générateur. Pour la même raison, nous n'avons pas pu effectuer des croisements, afin d'étudier la descendance

de ces plantes. Nous essayerons donc de faire ces études à la prochaine saison de 1947.

DISCUSSION

D'après les observations effectuées, il n'y a aucun doute que les micronoyaux formés à la microsporogenèse peuvent être inclus soit dans les noyaux des cellules génératrices, soit dans les noyaux des cellules végétatives, engendrés par la première mitose des grains de pollen. L'anaphase de la figure 6, Pl. I, montre tout de suite le mécanisme au moyen duquel cette inclusion peut avoir lieu, et qui peut être décrit de la façon suivante: — Les micronoyaux peuvent occuper dans le cytoplasme des grains de pollen une position variable, et ils peuvent quelquefois se trouver au voisinage des pôles du fuseau de la première division. Lorsque cela arrive, les micronoyaux pourront, à l'anaphase ou au commencement de la télophase, être inclus dans les groupes polaires, et apparaître ainsi, plus tard, au dedans soit des noyaux générateurs, soit des noyaux végétatifs. Dans le cas de la figure 6, Pl. I, le micronoyau se trouve au voisinage du pôle du noyau générateur, et, par suite de cette localisation, il serait certainement inclus dans ce noyau.

L'apparition de micronoyaux dans les noyaux végétatifs est plus fréquente que dans les noyaux générateurs. Cette particularité résulte, certainement, du fait que les micronoyaux se trouvent, le plus souvent, écartés de la paroi et localisés vers la région centrale des grains de pollen. Pour cette raison, les noyaux végétatifs auront plus de chances d'inclure les micronoyaux que les noyaux générateurs.

Après la première mitose, les micronoyaux pourront donc se trouver soit dans le cytoplasme, soit au dedans des noyaux générateurs ou végétatifs. Quel est le devenir de tous ces micronoyaux? Examinons tout d'abord les micronoyaux qui ont demeuré toujours dans le cytoplasme et ceux qui ont été inclus dans les noyaux végétatifs, puisque leur devenir est le même.

Nos observations montrent que ces micronoyaux subissent des transformations aboutissant à la formation d'images traduisant des phénomènes de pycnose, et, plus tard, de dégénérescence. Les transformations sont graduelles et relativement lentes, puisque la résorption des micronoyaux n'est pas encore achevée quelque temps après la première division des noyaux des grains de pollen. Les images trouvées peuvent s'ordonner dans une série, qui montre les diverses étapes conduisant à la dégénérescence et à la résorption (fig. text. 3). Tout d'abord, les micronoyaux subissent une diminution de volume, en même temps que leur chromaticité devient plus grande. La continuation de ce processus mène à la formation de micro-

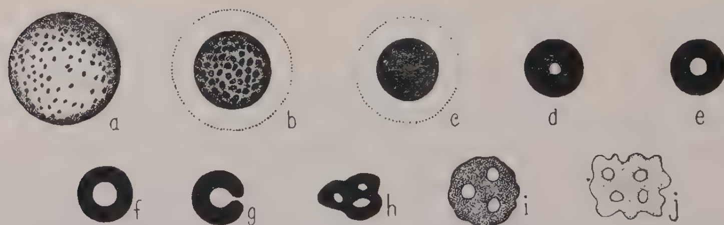


Fig. 3. — Schéma montrant les transformations subies par les micronoyaux demeurant dans le cytoplasme ou dans les noyaux végétatifs. Explication dans le texte.

noyaux à structure granulaire, qui peuvent être enveloppés par une aire claire (fig. text. 3*b*). Ces micronoyaux subissent une nouvelle réduction de volume, en se transformant en des corps assez compacts et intensivement colorés, enveloppés parfois par une aire claire (fig. text. 3*c*). Les transformations continuent, et une petite aire claire, probablement de nature vacuolaire, fait son apparition dans la région centrale des corps compacts (fig. text. 3*d*). L'aire claire centrale devient progressivement plus grande (fig. text. 3e, *f*) et la région compacte périphérique commence à se désintégrer. Cette désintégration mène à la formatiom de micronoyaux à structure vacuolaire (fig. text. 3*h*, *i*), se colorant peu intensivement par le Feulgen, et qui présentent tout d'abord un contour régulier, qui

devient plus tard amiboïde (fig. text. 3*j*). L'intensité de coloration devient encore plus faible et les corps finissent par disparaître.

Nous ne connaissons pas encore les réactions qui ont lieu pendant les transformations que nous venons de décrire. Cependant, nous pourrons supposer que les micronoyaux subissent tout d'abord une déshydratation, phénomène qui mènerait à la diminution de volume et à l'augmentation de la chromaticité. Au moyen de ce processus, qui pourrait être accompagné par d'autres réactions inconnues, des micronoyaux à structure granulaire prendraient naissance. L'apparition d'aires claires à la périphérie de ces corps est d'accord avec ce point de vue. Les phénomènes de déshydratation continueraient, et ceux-ci aboutiraient à la formation d'un coagulum de protéines et d'acide thymonucléique, qui correspondrait aux micronoyaux à structure compacte. Les protéines et l'acide thymonucléique commenceraient alors à se désintégrer sous l'action des enzymes existant soit dans le milieu environnant, soit dans les micronoyaux eux-mêmes, et cette désintégration mènerait à la formation de micronoyaux vacuolaires, dont les produits seraient plus tard intégrés dans la matière cytoplasmique ou nucléaire.

En ce qui concerne les micronoyaux inclus dans les noyaux générateurs, le problème n'est pas facile à résoudre. Une fois que les micronoyaux subissent des transformations jusqu'au moment où ils sont inclus, nous devrions tout d'abord établir le degré de transformation acquis par ces corps lors de leur inclusion. Malheureusement, notre matériel était assez pauvre en figures de mitose, ce qui nous a empêché d'étudier en détail cette importante question. Le fait que nous avons trouvé une anaphase, où un micronoyau compact était visible au voisinage du pôle du noyau générateur (fig. 6, Pl. I), et le fait que nous avons trouvé un micronoyau à structure granulaire englobé montrent que les micronoyaux peuvent avoir acquis des degrés de transformation différents au moment de leur inclusion.

Quant aux micronoyaux pourvus d'une aire claire centrale que nous avons identifiés au dedans des noyaux

générateurs, deux hypothèses pourront se formuler, puisqu'ils pourraient avoir été englobés à cet état, ou ils pourraient provenir de la transformation de micronoyaux compacts. Malheureusement, nous n'avons pas pu nous décider entre ces deux possibilités.

On a trouvé un grain de pollen où existaient deux micronoyaux: un localisé au dedans du noyau générateur et l'autre dans le cytoplasme de la cellule végétative (fig. text. 1 et fig. 8, Pl. I). Le premier était à l'état compact, tandis que le deuxième se montrait déjà à un état de désintégration plus avancé. Cette observation, en connexion avec les autres, nous a amené à formuler l'hypothèse suivante:

Les micronoyaux peuvent être inclus dans les noyaux générateurs à différents états de transformation. Ceux qui ont abouti déjà à un état relativement avancé continueront à subir la désintégration, et ils seront digérés comme ceux qui demeurent dans le cytoplasme ou dans les noyaux végétatifs. Par contre, les micronoyaux qui n'ont pas subi encore de transformations assez profondes, peut-être ceux correspondant à la structure granulaire et compacte, pourraient, par le fait que les transformations subies seraient partiellement réversibles, être sauvés de la dégénérescence par suite de leur inclusion dans un noyau qui ne dégénère pas. Ces micronoyaux engendreraient, à la prochaine mitose du noyau générateur, des chromosomes (on sait que le plus souvent les micronoyaux correspondent à des chromosomes isolés), qui seraient, à notre avis, des chromosomes surnuméraires hétérochromatiques du type de ceux qui ont été trouvés chez *Narcissus juncifolius* (Fernandes, 1939 *b*), *N. Bulbocodium* (Fernandes, 1943) et beaucoup d'autres espèces de Phanérogames (v. Fernandes, 1946). Les chromosomes surnuméraires hétérochromatiques seraient ainsi des chromosomes des garnitures normales devenus pycnotiques, à cause de leur passage par le cytoplasme. La conversion de l'euchromatine en hétérochromatine serait la conséquence de réactions chimiques encore inconnues, survenues, probablement, aux premiers stades de la pycnose, au moyen desquelles l'acide thymonucléique et les autres composants de la matrix s'atta-

cheraient aux protéines des chromonemata d'une façon permanente. La transformation de l'euchromatine en hétérochromatine serait ainsi irréversible, et elle pourrait être provoquée soit par une modification chimique des substances de la matrix, soit par des altérations des protéines des chromonemata, soit encore par des modifications survenues simultanément dans les composants de la matrix et des chromonemata.

Cette hypothèse sur l'origine des chromosomes surnuméraires hétérochromatiques est susceptible d'être confirmée ou infirmée. En effet, si les choses ont lieu de la façon suggérée, nous devrons nous attendre à voir apparaître des chromosomes surnuméraires hétérochromatiques à la division des noyaux générateurs de *N. jonquilloides*, ainsi que dans la descendance de ces plantes. Nous essayerons de résoudre ces problèmes pendant la prochaine saison.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

1 — Les micronoyaux formés à la microsporogenèse de *N. jonquilloides* Willk. peuvent demeurer dans le cytoplasme, ou être inclus soit dans les noyaux générateurs, soit dans les noyaux végétatifs des grains de pollen.

2 — Le mécanisme de l'inclusion des micronoyaux dans les noyaux est assez simple: les micronoyaux, localisés au voisinage des pôles du fuseau, sont englobés, à l'anaphase ou aux premiers stades de la télophase, dans les groupes polaires, demeurant ainsi au dedans des noyaux.

3 — Le noyau végétatif englobe les micronoyaux plus fréquemment que le noyau générateur. Ce fait est d'accord avec la position spéciale du fuseau, dont le pôle générateur est en contact avec la paroi interne du grain de pollen, tandis que le pôle végétatif est situé vers la région centrale. Par suite de cette localisation, le groupe polaire qui émigre vers le pôle végétatif, ayant une plus grande surface de contact avec le cytoplasme, aura plus de probabilités d'englober les micronoyaux.

4 — Les micronoyaux qui ont persisté toujours dans le cytoplasme et ceux qui ont été inclus dans les noyaux végétatifs dégénèrent, et finissent par être résorbés. Les transformations qu'ils subissent sont lentes et graduelles, et les étapes suivantes ont pu être établies: a) diminution de volume et augmentation de chromaticité, d'où résulte la formation de micronoyaux à structure granulaire; b) accentuation de ces phénomènes, lesquels aboutissent à la formation de micronoyaux compacts; c) commencement de la désintégration, qui mène à la formation de micronoyaux pourvus d'une région périphérique compacte, soit complète, soit incomplète, et d'une région centrale plus claire, probablement de nature vacuolaire; d) accentuation de la désintégration, aboutissant à la formation de corps vacuolisés, se colorant faiblement par le Feulgen, tout d'abord à contour régulier et plus tard à contour amiboïde; e) disparition de ces corps.

5 — Le devenir des micronoyaux inclus dans les noyaux générateurs n'a pas pu être entièrement éclairci. D'après quelques observations, l'hypothèse suivante a été suggérée: — Les micronoyaux inclus à un état de transformation relativement avancé subiront la désintégration complète, finissant par être digérés, comme les micronoyaux inclus dans le noyau végétatif, ou qui ont demeuré dans le cytoplasme. Les autres micronoyaux à structure granulaire ou compacte, qui n'ont subi que les transformations des premiers degrés, seraient sauvés de la désintégration ultérieure par leur inclusion dans les noyaux générateurs. Ces micronoyaux engendreraient, à la prochaine division de ces noyaux, des chromosomes qui seraient des chromosomes surnuméraires hétérochromatiques du type de ceux qu'on a trouvés chez *N. juncifolius*, *N. Bulbocodium* et d'autres Phanérogames. Les transformations menant à la conversion de l'euchromatine en hétérochromatine consisteraient particulièrement en des réactions chimiques, survenues aux premiers stades de la pycnose, par suite desquelles les composants de la matrix, ou les protéines des chromonemata, ou encore des deux ensemble résulteraient modifiés.

En conséquence de ces altérations chimiques, les composants de la matrix resteraient attachés aux protéines des chromonemata d'une façon permanente.

BIBLIOGRAPHIE

BABCOCK, E. B. et EMSWELLER, S. L.

1936 Meiosis in certain interspecific hybrids in *Crepis* and its bearing on taxonomic relationship. *Univ. Calif. Publ. Agric. Sci.*, **6**, 325-368.

CHANDLER, C., PORTERFIELD, W. M. et STOUT, A. B.

1937 Microsporogenesis in diploid and triploid types of *Lilium tigrinum* with special references to abortions. *Cytologia*, **Fujii Jubilaei Volumen**, 756-784.

FERNANDES, A.

1937 Le problème de *Narcissus Tazetta* L. I — Les formes à 22 chromosomes somatiques. *Bol. Soc. Broteriana*, **12** (2.ª série), 159-219.

1939*a* Sur l'origine du *Narcissus jonquilloides* Willk. *Scientia Genetica*, **1**, 16-61.

1939*b* Sur le comportement d'un chromosome surnuméraire pendant la mitose. *Scientia Genetica*, **1**, 141-167.

1943 Sur l'origine des chromosomes surnuméraires hétérochromatiques chez *Narcissus Bulbocodium* L. *Bol. Soc. Broteriana*, **17** (2.ª série), 251-256.

1946 Sur le comportement des chromosomes surnuméraires hétérochromatiques pendant la méiose. I. Chromosomes longs hétérobrachiaux. *Bol. Soc. Broteriana*, **20** (2.ª série), 93-154.

HEITZ, E.

1936 Die Nukleal-Quetschmethode. *Ber. d. Deut. Bot. Gesel.*, **53**, 870-878.

HOLLINGSHEAD, L.

1930 Cytological investigations of hybrids and hybrid derivatives of *Crepis capillaris* and *Crepis tectorum*. *Univ. Cal. Publ. Agric. Sci.*, **6**, 55-94.

IWATA, K.

1939 Karyogenetische Untersuchungen der Bastarde zwischen Varietäten der Art *Aegilops triuncialis*. *Jap. Journ. Genetics*, **14**, 159-171.

KOSTOFF, D.

1938 Irregular meiosis and abnormal pollen-tube growth induced by acenaphthene. *Current Science*, **7**, 8-11.

LA COUR, L.

1937 Improvements in plant cytological technique. *Bot. Rev.*, **3**, 241-258.

LEVAN, A.

1939 Amphibivalent formation in *Allium cernuum* and its consequences in the pollen. *Bot. Not.*, 256-260.

1940 The cytology of *Allium amplectens* and the occurrence in nature of its asynapsis. *Hereditas*, **26**, 353-394.

LÖVE, A.

1944 Cytogenetic studies on *Rumex* subgenus *Acetosella*. *Hereditas*, **30**, 1-136.

NAGAO S.

1935 Distribution of chromosomes in pollen grains in certain triploid and hypertriploid *Narcissus* plants. *Jap. Journ. Genetics*, **11**, 1-5.

OLMO, H. P.

1936 Cytological studies of monosomic and derivative types of *Nicotiana tabacum*. *Cytologia*, **7**, 143-159.

SATINA, S. et BLAKESLEE, A. F.

1937 Chromosome behavior in triploids of *Datura stramonium*. I. The male gametophyte. *Amer. Journ. Bot.*, **24**, 518-527.

WAKAR, B. A.

1936 Cytologische Untersuchung über F1 der Weizen-Queckengras Bastarde. *Cytologia*, **7**, 293-312.

EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE I

Figs. 1-3. — *Narcissus jonquilloides* Willk. Jeunes tétrades montrant des micronoyaux (flèches) demeurant dans le cytoplasme des microspores. Navachine-violet de gentiane.

Fig. 4. — *Narcissus Tazetta* L. var. *Panizzianus* (Parl.). Grain de pollen à l'intercinèse montrant un micronoyau (flèche). Flemming-Benda-Feulgen.

Fig. 5. — *Idem*. Grain de pollen montrant un micronoyau (flèche) à structure compacte. Alcool acétique-Feulgen.

Fig. 6. — *Narcissus jonquilloides* Willk. Anaphase de la première mitose du noyau d'un grain de pollen. Remarquer l'existence d'un micronoyau compact (flèche) au voisinage du pôle du noyau générateur. Ce micronoyau devrait probablement être inclus dans le noyau générateur. Carmin-acétique.

Fig. 7. — *Idem*. Micronoyau à structure granulaire (flèche) inclus dans le noyau générateur. Carmin-acétique.

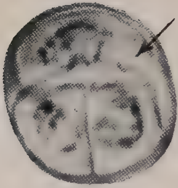
Fig. 8. — *Idem*. Grain de pollen bicellulaire, montrant deux micronoyaux: un (flèche inférieure), à structure compacte, inclus dans le noyau générateur, et l'autre (flèche supérieure) dans le cytoplasme de la cellule végétative. Remarquer que le deuxième micronoyau se montre constitué par une région périphérique compacte, en forme de croissant, et une autre centrale claire. Carmin-acétique.

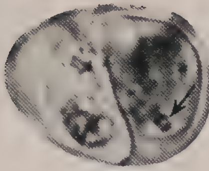
Figs. 9 et 10. — *Idem*. Micronoyaux (flèches), constitués par une région compacte périphérique et une autre claire centrale, inclus dans les noyax générateurs. Carmin-acétique.

Fig. 11. — *Idem*. Micronoyau (flèche) petit et compact dans le cytoplasme de la cellule génératrice. Carmin-acétique.

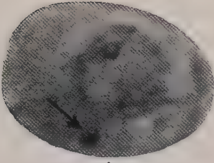
Fig. 12. — *Idem*. Micronoyau (flèche) à structure vacuolaire, localisé dans le cytoplasme de la cellule génératrice. Carmin-acétique.

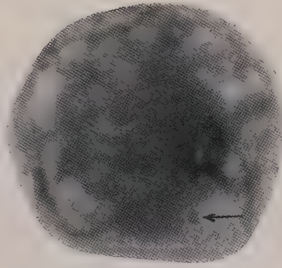
× 850.

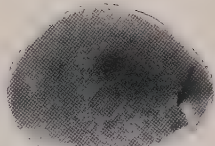

1


2

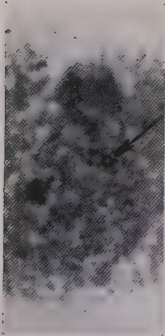

3

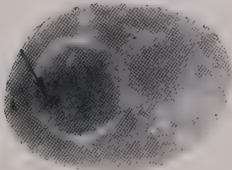

4

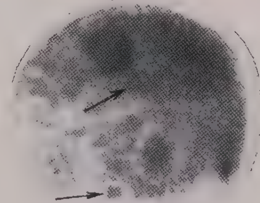

6

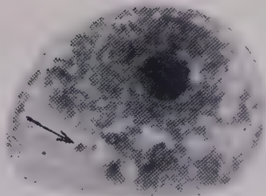

7


5


10


9


8


11

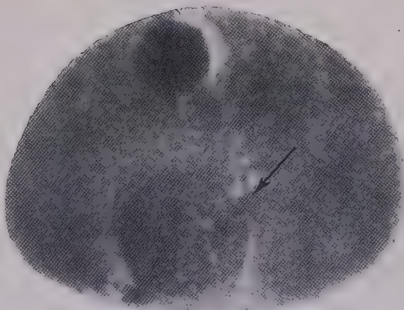

12

PLANCHE II

Fig. 1. — *Narcissus jonquilloides* Willk. Micronoyau (flèche), à structure compacte, localisé au voisinage du nucléole du noyau végétatif. Carmin-acétique.

Fig. 2. — *Idem.* Micronoyau (flèche) inclus dans le noyau végétatif. Carmin-acétique.

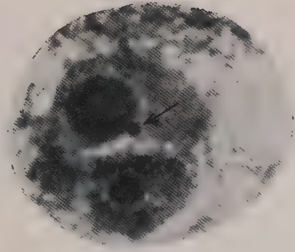
Fig. 3. — *Idem.* Micronoyau (flèche), à structure granulaire, localisé vers la périphérie du noyau végétatif. Carmin-acétique.

Fig. 4. — *Idem.* Micronoyau (flèche), montrant une région périphérique compacte, en forme de croissant, et une autre plus claire, localisé au dedans du noyau végétatif. Carmin-acétique.

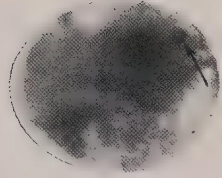
Fig. 5. — *Idem.* Micronoyau (flèche) à structure compacte, localisé dans le cytoplasme de la cellule végétative. Remarquer l'aire claire environnante. Carmin-acétique.

Figs. 6-8. — Micronoyaux (flèches) dans le cytoplasme de la cellule végétative. Carmin-acétique.

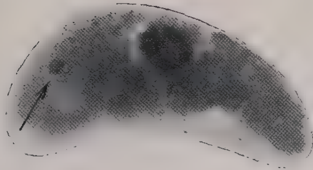
× 850.



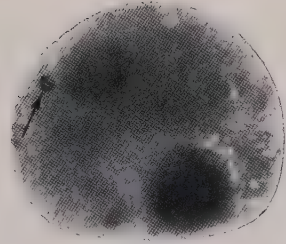
1



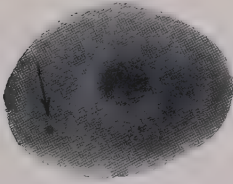
2



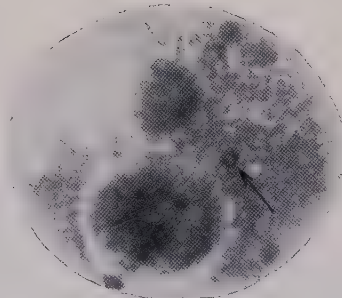
3



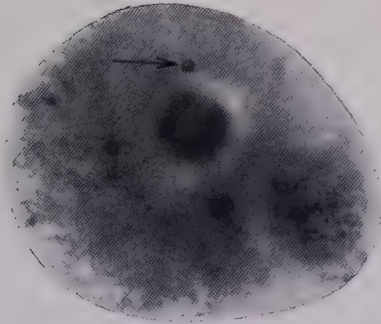
4



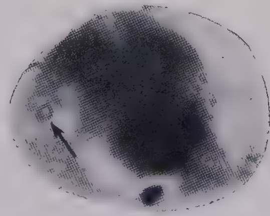
5



6



7



8

PLANCHE III

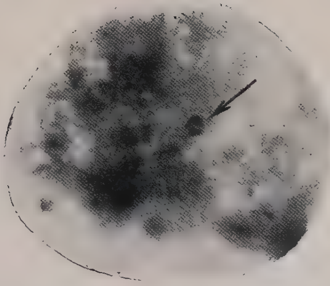
Figs. 1-5. — *Narcissus jonquilloides* Willk. Micronoyaux (flèches) localisés dans le cytoplasme de la cellule végétative, montrant différents états de dégénérescence. Carmin-acétique.

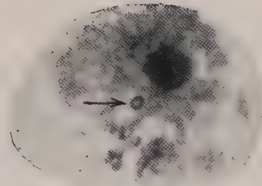
Fig. 6. — *Narcissus Tazetta* L. var. *Panizzianus* (Parl.). Micronoyau (flèche) à structure vacuolaire se colorant encore par le Feulgen. Flemming-Benda-Feulgen.

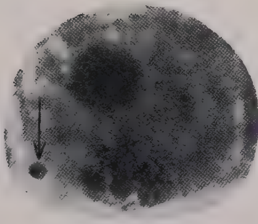
Fig. 7. — *Narcissus jonquilloides* Willk. Grain de pollen montrant un micronoyau (flèche) relativement volumineux, dont la structure rappelle celle présentée par les noyaux normaux à l'état de « spirème ». Carmin-acétique.

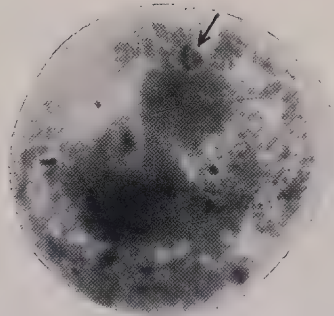
Fig. 8. — *Idem*. Micronoyau (flèche) encore plus volumineux que celui de la figure antérieure, montrant aussi l'aspect de «spirème». Carmin-acétique.

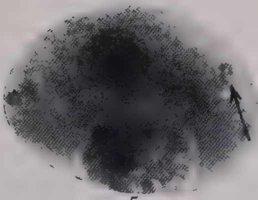
× **850.**

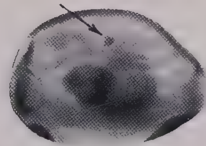

1

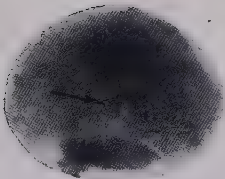

2

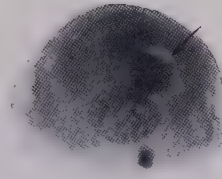

3


4


5


6


7


8

SOBRE A CARIOLOGIA DE SALIX SALVIIFOLIA *BROT.* E S. BABYLONICA *L.*

por

JOSÉ LEÃO FERREIRA DE ALMEIDA
(Estação de Experimentação Florestal do Sobreiro)

INTRODUÇÃO

NUMA tentativa de revisão da sistemática do género *Salix* em Portugal (Almeida, 1944) primeiro passo para o seu estudo económico e de aproveitamento florestal, deparámos com dificuldades de tal natureza que nos pareceu indispensável recorrer a estudos de cariologia comparada, precioso auxiliar da sistemática, para a destrinça dos casos mais difíceis.

Os estudos cariológicos das Salicáceas são relativamente recentes. Particularmente no que se refere ao género *Salix*, estes estudos são bastante limitados, facto que é sem dúvida devido ao pouco de atractivo que nos apresenta a sua cariologia. Com efeito, o número básico é bastante elevado, sendo os cromosomas de diminutas dimensões e, aparentemente, destituidos de caracteres morfológicos distintivos. Assim se compreende que, de cerca de 300 espécies que formam o género, apenas aproximadamente 40 estejam estudadas do ponto de vista cariológico (v. Darlington e Janaki-Ammal, 1945).

Como se trata de um grupo de plantas em que estes estudos são particularmente difíceis, os investigadores quase se têm limitado à determinação do número de cromosomas somáticos e à observação do comportamento meiótico.

Deve-se a Blackburn e Harrison (1924) a determinação do número básico das Salicáceas, $n = 19$, feita em três espécies do género *Populus* e 15 do género *Salix*. Estes autores encontraram em *S. triandra*, além de formas

com o número básico 19, uma outra com o número gamético 22, e em *S. phylicifolia* contaram n = 44. Este facto sugere-lhes a existência de uma segunda série ortoplóide, com o número básico 22: «From a prolonged consideration of the preparations (dizem os referidos autores) we were driven to the conclusion that this second type of *S. triandra* arises from the first through a break in one or more compound chromosomes». Um fenómeno semelhante deve, segundo os mesmos autores, ter originado *S. phylicifolia* com n = 44. As formas de *S. triandra* com 22 cromosomas seriam formas diplóides modificadas, enquanto *S. phylicifolia* seria um tetraplóide modificado.

Estes autores observaram ainda pequenas anormalidades na meiose de *S. fragilis*, *S. aurita* e *S. andersoniana*, facto que lhes sugere uma origem híbrida para estas espécies.

Do estudo meiótico a que procederam em 3 híbridos (*S. viminalis* × *purpurea*, *S. Caprea* × *lanata* e *S. aurita* × × *phylicifolia*), referem irregularidades apenas para o terceiro, as quais se traduzem pelo aparecimento de univalentes retardatários, formação de micronúcleos e pólen abortado.

Indicam, sob reserva, a existência de heterocromosomas em *S. viminalis* (um par heteromórfico).

Todos os investigadores (Harrison 1926, Hakansson 1929, 1933, Nilsson 1928, 1935, Sinotô 1929, Marklund 1942, Holmberg 1931, Nakajima 1937, Bowden 1940, Sokolovskaja e Strelkova 1941, Wilkinson 1941, etc.), que fizeram detreminações do número de cromosomas somáticos em espécies de *Salix* posteriormente a Blackburn e Harrison (1924), puderam verificar que o número básico 19 indicado por estes autores era exacto.

Nilsson (1928), Hakansson (1929 e 1938) e Wilkinson (1941) procederam ao estudo cariológico de vários híbridos e encontraram, como Blackburn e Harrison, um comportamento meiótico regular em muitos casos.

Nilsson estudou a cariologia de *S. laurina* (= *S. viminalis* × *Caprea*), encontrando 2 n = 76. Em 1935, verificou o aparecimento na F_1 de *S. laurina* × *phylicifolia* de indi-

víduos poliplóides (*S. superlaurina*), com 2 n = 152. Este trabalho tinha sido empreendido com o fim de determinar os progenitores de *S. laurina* e o autor concluiu que eram *S. viminalis* e *S. Caprea* e não *S. cinerea* e *S. phylicifolia*, como supunha SKOVSTEDS (1929).

HAKANSON (1929), procedendo ao estudo do híbrido *S. viminalis* × *Cprea*, verificou tratar-se de um diplóide em que a meiose decorria com regularidade. *S. viminalis* e *S. Caprea* eram igualmente diplóides. Na F_2 deste híbrido encontrou formas gigantes triplóides e um indivíduo extravagante hipertetraplóide que o autor considera *S. laurina*. Este indivíduo possue uma meiose muito irregular. O híbrido resultante de *S. repens* × *viminalis* era tetraplóide (ou hipotetraplóide).

Em 1933, HAKANSSON estudou os híbridos *S. nigricans* (n = 57) × *S. phylicifolia* (n = 57) e [*S. nigricans* (n = 57) × × *S. philicifolia* (n = 57)] × [*S. viminalis* (n = 19) × *S. Caprea* (n = 19)], encontrando meioses quase regulares, com formação de bivalentes e alguns polivalentes e univalentes. Em 1938, prosseguiu o estudo do comportamento meiótico de outros híbridos. Os híbridos *S. purpurea* × × *hastata*, *S. aurita* × *hastata*, *S. repens* × *viminalis*, *S. viminalis* × *aurita* e *S. viminalis* × *daphnoides* apresentam 19 bivalentes e a meiose decorre normalmente. O híbrido diplóide (*S. purpurea* × *daphnoides*) × (*repens* × *aurita*) apresentava também meiose regular com 19 bivalentes. O híbrido entre as espécies *S. viminalis* (diplóide) e *S. phylicifolia* (hexaplóide) era tetraplóide, mostrando uma meiose regular formando-se frequentemente 38 bivalentes na metafase I; algumas vezes, porém, encontrou um ou mais multivalentes. Num cruzamento em que entraram 8 espécies, formado pelo híbrido diplóide (*S. purpurea* × × *daphnoides*) × (*repens* × *aurita*) e pelo tetraplóide *S.* (*phylicifolia* × *nigricans*) × (*viminalis* × *Caprea*) encontrou dois indivíduos tetraplóides em que a meiose decorria com certa regularidade. Nos cruzamentos em que entrava *S. cinerea* como progenitor, os híbridos apresentavam uma meiose irregular. Assim, os híbridos triplóides, resultantes de *S. repens* × *cinerea*, *S. viminalis* × *cinerea*, *S. Caprea* ×

cinerea, *S. aurita* × *cinerea*, *S.* (*viminalis* × *Caprea*) × × *cinerea*, e o híbrido pentaplóide resultante do cruzamento de *S. cinerea* × *phylicifolia*, tinham meiose irregular.

Wilkinson (1941), baseando-se na cariologia comparada de *S. alba* e *S. fragilis*, conclui que *S. caerulea* é uma variedade de *S. alba* e não um híbrido. A sua conclusão baseia-se, em especial, na posição de constrições e existência de satélites.

Em 1944, Wilkinson estuda pormenorizadamente várias espécies e híbridos. Determina a constituição somática de algumas espécies, verificando a existência de vários graus de poliploidia quer para a base 19, estabelecida por Blackburn e Harrison (1924), quer para a base 22, sugerida por estes autores. Faz uma tentativa de distinção idiogramática das espécies, servindo-se de características tais como: existência de satélites, existência ou ausência de constrições secundárias, etc..

A observação de Blackburn e Harrison de que era possível distinguir heterocromosomas em algumas espécies do género *Salix* foi posteriormente confirmada por Sinotô (1929), em *S. japonica*, *S. leucopithecia*, *S. melanostachys*, *S. gracilistyla*, *S. sachalinensis* e *S. viminalis* var. *yezoensis* e por Nakajima (1937) em *S. Caprea*, *S. Bakko*, *S. grandulosa*, *S. integra*, *S. sachalinensis* e *S. babylonica*.

Neste nosso trabalho procuramos contribuir para o alargamento dos conhecimentos sobre a cariologia do género *Salix*, com o estudo de *S. salviifolia* Brot. e *S. babylonica* L., porquanto *S. salviifolia* é uma espécie da península Ibérica cuja cariologia era totalmente desconhecida e *S. babylonica* não foi ainda estudada com suficiente pormenor.

* * *

Estes estudos foram efectuados no Instituto Botânico de Coimbra. Queremos, por este facto, testemunhar aqui a nossa maior gratidão e profundo reconhecimento ao Excelentíssimo Director deste Instituto, Professor Doutor Abílio Fernandes, nosso iniciador em cariologia, pelas facilidades

que nos concedeu pondo à nossa disposição todo o material que nos foi preciso bem como pela crítica e sugestões que nos ia dando sempre que delas carecíamos.

Não podemos esquecer também o nosso querido Amigo, Senhor António Cabral, pelos ensinamentos e auxílio de caracter técnico que, solícito, sempre nos dispensou.

MATERIAL E TÉCNICA

Efectuamos o estudo cariológico de *S. salviifolia* Brot. e de *S. babylonica* L. em material das seguintes procedências:

1. *S. salviifolia* Brot. — Coimbra — Jardim Botânico;
2. » » » — » — Choupal (vários indivíduos);
3. » » » — S.ta Comba Dão — Rio Dão (vários indivíduos);
4. *S. babylonica* L. — Azambuja;
5. » » » — Coimbra — Choupal;
6. » » » — » — Penedo da Saudade;
7. » » » — » — Jardim dos Patos;
8. » » » — » — Jardim do Doutor Bissaia Barreto.

Para a obtenção de meristemas radiculares, colocámos ramos em água com um pouco de terra vegetal. Nestas condições, os ramos produziram raízes com profusão, fornecendo-nos o material que necessitávamos.

A delicadeza do material obrigou-nos a uma larga experimentação de fixadores antes de nos decidirmos por um. Experimentámos, com relativo insucesso, os líquidos de Karpechenko, 2BD de La Cour, cromo-acético-ósmico de Chicago, cromo-formol de Lewitsky, Flemming-Benda, 2BE de La Cour, Carnoy (6:3:1) seg. Meürman (1925), S. Navachine e Bouin. Só os fixadores de Craf, Nav. seg. Bruun, para maristemas radiculares, e àlcool acético (3:1) para anteras em divisão, nos deram resultados favoráveis. Foram estes os que utilizámos. Os outros, quer por conservarem o citoplasma (La Cour), quer por provocarem

plasmólise (Karpechenko), quer ainda pelo facto da sua penetração ser demorada (Flemming, Lewitsky, cromo-acético de Chicago), não satisfaziam aos requisitos de La Cour (1931).

As técnicas usadas foram as indicadas por La Cour (1931), Chamberlain (1932) e Johansen (1940) com pequenas alterações, de acôrdo com as exigências do material.

Experimentámos muitas vezes a modificação de Warmke (1942) ao método de coloração de Feulgen. Esta modificação, tão atraente, não nos deu porém, o mais pequeno resultado pela dificuldade de localizar a célula isolada. O «Nukleal-Quetschmethod» de Heitz (1936) também não pôde ser utilizado, pelo facto de as placas equatoriais nos aparecerem sempre de lado.

Como corantes, utilizámos a hematoxilina férrica e a violeta de genciana nos meristemas radiculares, e o carmim acético e orceína acética em esfregaços de anteras, segundo as técnicas de McClintock (1929) e La Cour (1931).

Fizemos apenas cortes transversais com uma espessura de 12 μ. Os desenhos foram feitos à câmara clara, utilizando o microscópio Seibert-Wetzlar, objectiva de imersão 100, oculares 6 x, 12 x, 15 x, 18 x, 20 x, 30 x; aparelho de iluminação da casa Leitz, 100 w. As microfotografias foram obtidas com o Citophot Busch.

OBSERVAÇÕES

O elevado número básico das Salicáceas e as exíguas dimensões dos cromosomas dificultam extraordinàriamente a apreciação da sua forma, impossibilitando-nos, por vezes, de determinar com exactidão o número somático das espécies.

Johnsson (1940), servindo-se do formol cromo-acético e da violeta de genciana no estudo de algumas espécies diplóides de *Populus*, refere-se às determinações dos números de cromosomas somáticos nos seguintes termos: «These chromosomes numbers, however, are not determined with absolute accuracy; the error is on an average ± 1 chromosome. The reason for this is the great difficulty

of making an accurate count of the somatic chromosome number (cf. MÜNTZING, 1936; BERGSTROM, 1940) owing to the fact that practically in all plates the very small chromosomes, at least at some point, are crowded, making a clear distinction impossible, or the median constriction of some chromosome may be long and uncoloured, so that this chromosome migth have been counted as two».

Apesar das dificuldades de estudo apontadas, é, todavia, possível distinguir cromosomas com o aspecto de pequenos bastonetes, direitos ou ligeiramente recurvados, e outros em V muito nítido. Por vezes, em uma ou outra figura, foi possível identificar cromosomas satelitíferos, (fig. 1 *a*). Não nos foi possível, porém, a determinação de cada um dos tipos nem a sua representação idiogramática, embora WILKINSON (1944) diga ser possível identificar, em híbridos de *Salix*, os respectivos progenitores pela morfologia dos cromosomas. Não pudemos mesmo distinguir as três classes de cromosomas referidos por este autor: com satélite, com constrição, sem constrição.

S. salviifolia Brot.

Mitose. — Nada se conhecia, até hoje, da cariologia de *S. salviifolia* Brot.. O número de cromosomas somáticos desta espécie foi determinado em vários indivíduos. O exemplar n.° 1 e os do n.° 2 mostraram que esse número era 38 (fig. 1 *a*). Na população de Santa Comba apareceram, porém, indivíduos em que o número variava de 38 a 42. Provàvelmente, trata-se de cromosomas supranumerários heterocromáticos (fig. 1 *b*), tal como os que aparecem em várias outras plantas [*Zea mays* (RANDOLPH, 1928 *a*, *b*; MCCLINTOCK, 1933; DARLINGTON e UPCOTT, 1941); *Narcissus juncifolius* (FERNANDES, 1939; *N. Bulbocodium* (FERNANDES, 1943; FERNANDES e SERRA, 1944), etc.].

O facto de aparecerem, no mesmo corte, placas em que é possível determinar com exactidão 38 cromosomas e outras em que este número é acrescido de 1 a 4 supranumerários, resulta provàvelmente do facto de estes ele-

mentos poderem ser eliminados no decurso da mitose (Fernandes, 1943).

O estudo da meiose, referido adiante, levou-nos também à conclusão de que se tratava de cromosomas supranumerários heterocromáticos (fig. 2).

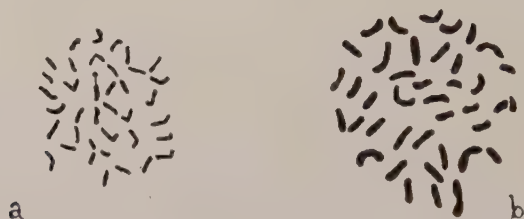


Fig. 1. — *S. salviifolia* Brot. *a*, Metafase em uma célula meristemática da raiz, 2n = 38. Craf-Hemat. férrica. × 2.500; *b*, Metafase em uma célula de vértice vegetativo da raiz, mostrando 2 cromosomas supra heterocromáticos. Craf-Hemat. férrica. × 3.800.

Meiose. — Não nos foi possível estudar os estados anteriores à diacinese. Este estado parece ser extremamente rápido, a avaliar pelo diminuto número de figuras que encontrámos. Das muitas preparações observadas, podemos concluir que, pondo de lado os cromosomas supranumerários, se formam 19 II (figs. 2 *a* e *b*). Nalguns casos, porém, verificámos (fig. 4 *a*), a existência de univalentes.

As células-mães de pólen do exemplar número três apresentam, com frequência, pequenos cromosomas intensamente corados. Estes cromosomas podem ser vistos nos estados anteriores à diacinese, pelo facto de se apresentarem compactos e mais intensamente corados, o que revela a sua natureza heterocromática. Nas diacineses e metafases aparecem geralmente três (fig. 2 *c*), menos vezes 4 (fig. 2 *a*) e ainda menos frequentemente 1 ou 2 (fig. 3 *a*). Além de poderem emparelhar uns com os outros (fig. 3 *c*), esses cromosomas podem aparecer também ligados com os cromosomas longos (fig. 2 *c* e 3), resultando assim formações com o aspecto de trivalentes, em que um dos elementos é de minúsculas dimensões. Estas imagens foram observadas com maior pormenor na metafase I, onde se nota que a

ligação do supranumerário se efectua mediante um filamento que, por vezes, atinge um comprimento relativamente considerável (figs. 2 c, 3 *a* e c, e microfotografia 2).

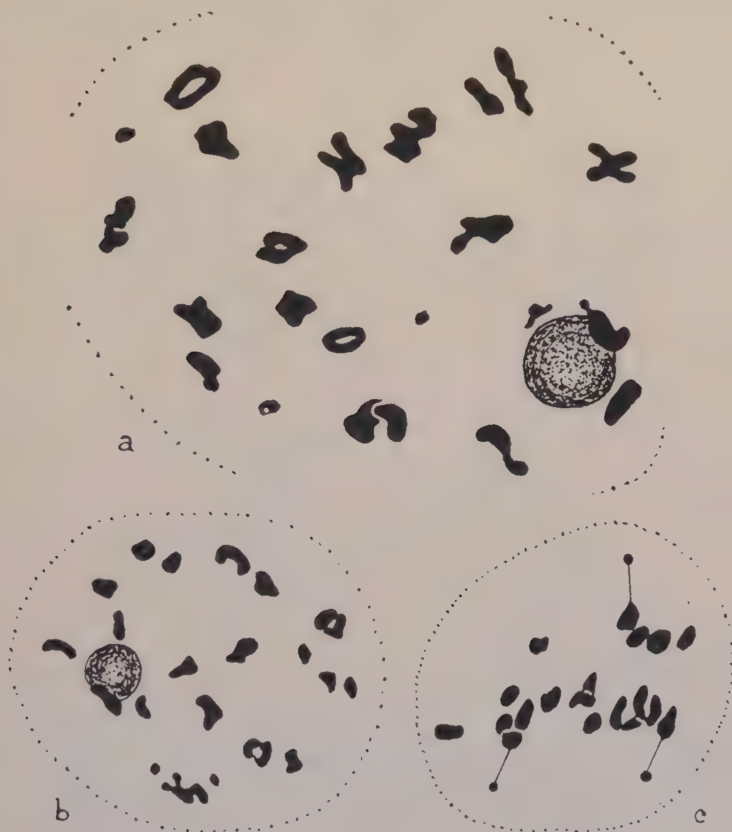


Fig. 2. — *S. salviifolia* Brot. *a*, Diacinese mostrando 19 II e 4 supra heterochromáticos. Alcool acético — carmim acético. × 2.500. *b*, Diacinese com 19 II + 2 supra hetero. Idem, idem. × 1.600. *c*, Metafase I. 19 II + 3 supra ligados aos bivalentes por um longo filamento. Idem, idem. × 2.000.

Pelo que se sabe sobre a falta de especificidade da heterocromatina no que respeita às suas capacidades de atracção (v. Fernandes, 1943, Thomas e Revell, 1946), poderemos pensar que as formações referidas representam verdadeiros trivalentes, resultantes do emparelhamento dos cromoso-

mas supranumerários heterocromáticos com a hererocromatina existente na extremidade de alguns cromosomas longos. No entanto, poderá também dar-se a possibilidade de elas serem originadas pela coalescência das matrizes. A não existência do mesmo número em todas as C. M. P.

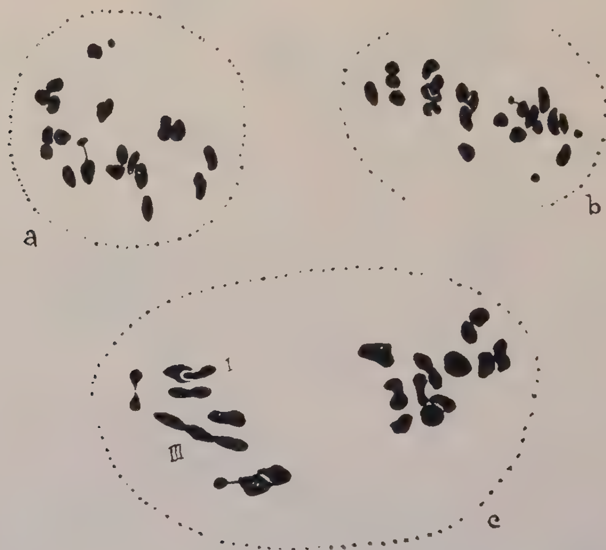


Fig. 3. — *S. salviifolia* Brot. *a*, Metafase I. Note-se a existência de cromosomas supra heterocromáticos e associações secundárias. Explicação no texto. Alcool acético — carmim acético. × 2.000. *b*, Metafase I que mostra cromosomas supra heterocromáticos e univalentes. Alguns bivalentes estão associados secundàriamente. Idem, idem. c, Metafase I mostrando $1_{III} + 17_{II} + 1_{I} + 3$ supra. Explicação no texto. Alcool acético—carmim acético. × 3.000.

(células-mães de pólen) mostra também que elas podem ser eliminadas no decurso da mitose.

À medida que se caminha para o final da diacinese, a força repulsiva que mantinha os bivalentes afastados vai enfraquecendo, de forma que, na prometafase, se esboçam já vários grupos que completam a sua associação secundária na metafase. Estas associações não são a continuação de polivalentes formados nos estados anteriores, mas sim arranjos que resultam de uma atracção especial

entre homólogos ou parcialmente homólogos. Estes grupos que aparecem na metafase I (figs. 3 *a*, 4 *b*, *c* e *d*) mantêm--se, podendo observar-se em estados subsequentes — anafase I (fig 5 *a*), telofase I (fig. 5 *b*) metafase II (fig. 5 *c*) e anafase II. Por vezes a associação é tão íntima que se torna difícil distinguir os elementos constituitivos (fig. 4 *b*

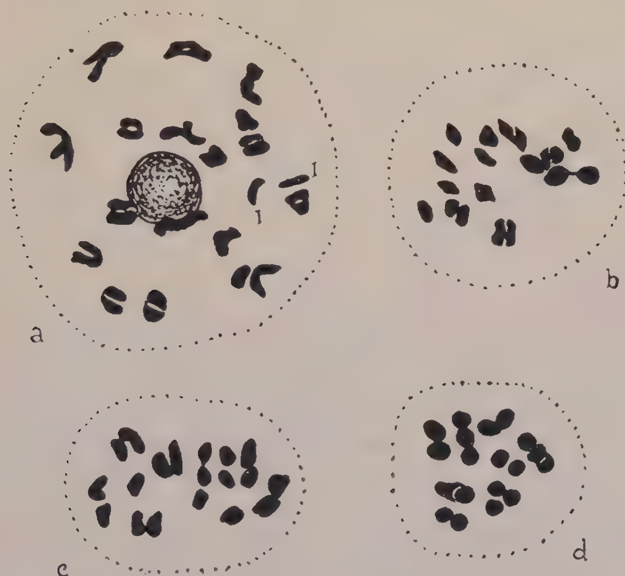


Fig. 4. — *S. salviifolia* Brot. *a*, Diacinese mostrando $18_{II} + 2_{I}$. Alcool acético—carmim acético. × 1.600. *b* e *c*, Metafases I mostrando 19_{II} alguns dos quais associados secundàriamente. Idem, idem. × 2.000. *d*, Metafase I em que se mostra o máximo de associação : 3 (3) e 5 (2). Explicação no texto. × 2.500.

e microfot. 3). De acordo com LAWRENCE (1931), MÜNTZING (1933), DARLINGTON (1932), NANDI (1936) *et al.*, trata-se de associações secundárias.

Em todas as metafases observadas se encontraram, em maior ou menor número, grupos de cromosomas secundàriamente associados. Esta associação deve poder dar-se pela facilidade de movimentação na metafase (DARLINGTON, 1937) dos pequenos cromosomas das *Salices*. A análise de metafases em que era fácil observar a constituição dos

grupos associados, mostrou-nos que o *máximo de associação era de 3 (3) + 5 (2) = 8, isto é, 3 grupos de 3 bivalentes e 5 grupos de 2 bivalentes, em um total de 8 grupos de 19 bivalentes* como mostra a fig. 4 *d* e a microfot. 4.

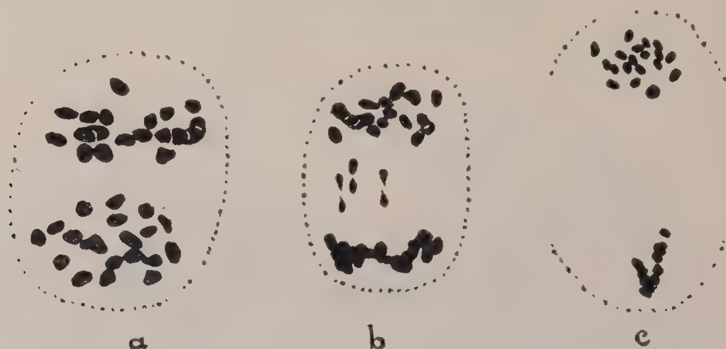


Fig. 5. — *S. salviifolia* Brot *a*, Anafase I vendo-se 19 cromosomas em cada grupo anafásico e notando-se associação secundária entre alguns deles. Alcool acético—carmim acético. × 2.000. *b*, Anafase--Telofase I mostrando 3 retardatários divididos e algumas associações secundárias. Idem, idem. × 2.000. *c*, Metafase II mostrando 19 cromosomas numa placa metafásica. Explicação no texto. Idem, idem. × 1.600.

Aparecem, como não pode deixar de ser, outras formas de agrupamento dependentes da posição relativa que ocupam no começo da metafase I os vários homólogos da guarnição. A análise de numerosas metafases permitiu--nos estabelecer a existência dos seguintes tipos de associação:

Grupos	Número de cromosomas em associação
8	3 (3) + 5 (2)
9	3 (3) + 4 (2) + 2 (1)
10	1 (3) + 7 (2) + 2 (1)
11	2 (3) + 4 (2) + 5 (1)
12	1 (3) + 5 (2) + 6 (1)
12	2 (3) + 3 (2) + 7 (1)
14	5 (2) + 9 (1)

O grau de homologia entre alguns cromosomas deve ter diminuido mais ou menos no decorrer dos tempos, em

consequência de alterações estruturais sofridas pelos cromosomas. Deste facto resulta que a probabilidade de formação da associação máxima fci dimimuindo a favor de outras formas de associação.

Em certas metafases (fig. 3 *b*), encontrámos um número de elementos superior a 19, o que denota a existência de univalentes, resultantes quer do facto de não ter havido emparelhamento quer de os elementos se terem separado.

A homologia entre certos elementos da guarnição haplóide, revelada pela existência de associações secundárias, é posta em evidência, de uma maneira bastante mais clara, pelo aparecimento de polivalentes. Entre as numerosas metafases observadas encontrámos uma em que identificamos trivalentes, com certeza absoluta. Essa metafase é representada pela fig. 8 e pela microfot. 1, e mostra a seguinte composição:

$$1_{III} + 17_{II} + 1_{I} + 3 \textit{ supra heterocromáticos}$$

Não encontrámos tetravalentes nem pentavalentes e hexavalentes, e, como o aparecimento de trivalentes era bastante raro, deveremos admitir que a formação de polivalentes não é frequente. Isto resulta, certamente, do facto de os cromosomas, primitivamente homólogos, se terem diversificado no decurso da evolução, possìvelmente pela acção de alterações estruturais. No entanto, o aparecimento, embora raro, de trivalentes é um valioso argumento a favor da poliplòidia secundária nas Salicáceas. As figs. 3 *b* e 4 *b* representam o aspecto geral das metafases. Na fig. 5 *a* vê-se uma anafase em que se distinguem, em cada grupo anafásico, os 19 cromosomas. É de notar a continuação das associações entre homólogos durante e após a disjunção anafásica. A fig. 5 *b* mostra uma disjunção anafásica em que, além dos dois grupos polares, se notam, no plano equatorial, três elementos, cujas metades se estão separando. Trata-se, possìvelmente, de univalentes retardatários que se dividem na primeira divisão.

Em todas as placas se verifica que os cromosomas possuem dimensões sensìvelmente semelhantes.

Em algumas espécies do gén. *Populus* pelo contrário,

como se pode observar nas figs. 6*a* (*P. nigra* L.) e 6*b* (*P. canadensis* Ait.) encontram-se cromosomas cujo tamanho difere bastante dos restantes. (Compare-se com as figs. 2 *a* e *b*).

Na fig. 6c vêem-se dois grupos telofásicos e dois cro-

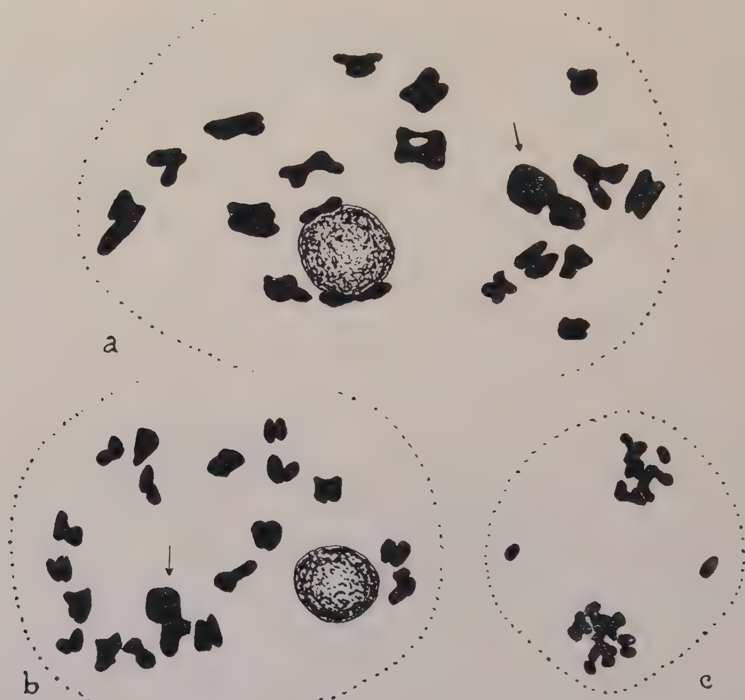


Fig. 6 *a*.—*Populus nigra* L. Diacinese que mostra um bivalente «gigante» cujo tamanho difere bastante dos restantes bivalentes. Alcool acético—carmim acético. × 2.500.

b.—*P. canadensis* (P. monilifera) Ait. Diacinese mostrando um bivalente «gigante». Idem, idem. × 2.000.

c.—*Salix salviifolia* Brot. Telofase I mostrando dois cromosomas excluidos dos grupos polares. Idem, idem. × 1.600.

mosomas excluidos dos grupos polares. Este tipo de irregularidade é muito raro. De um modo geral as anafases decorrem regularmente. Não observámos nenhum caso em que se desse a citocinese no final da telofase I.

Divisão homotípica. — Os fusos são, em regra, perpendiculares, resultando daqui células-mães de pólen com o aspecto representado pela fig. 5 *c*, em que se encontra uma metafase de tôpo e outra de perfil. Na metafase de tôpo vêem-se 19 cromosomas alguns dos quais associados secundàriamente. As associações entre os cromosomas na divisão homotípica são mais nítidas, se bem que seja difícil fazer a sua análise, em virtude das diminutas dimensões dos cromosomas. A disjunção anafásica é, em regra, sincrónica e decorre sem irregularidades, sendo por vezes possível contar 19 cromosomas em cada lado do plano equatorial. Na telofase II reaparecem os nucléolos, desintegra-se a matéria cromática, entra em acção o fragmoplasto resultando, em regra, 4 micrósporos. Poucos foram os casos encontrados em que apareciam micrócitos.

S. babylonica *L.*

A única referência que encontrámos à cariologia desta espécie é a de NAKAJIMA (1937). Este autor pretendia saber se *S. babylonica* possuia um par de cromosomas heteromórficos e, ao mesmo tempo, determinar o seu número haplóide. Pôde verificar a existência de um par hetero-



Fig. 7. — *S. babylonica* L. Metafase em uma célula maristemática da raiz. 2n = 76. Craf-Hematoxilina férrica. × 3.800.

mórfico mas, quanto ao número haplóide, diz: «I could not count the number of meiotic chromosomes».

Iniciámos o estudo desta espécie em meristemas radiculares dos exemplares números 4 a 8, os quais nos permitiram a determinação do seu número somático, 2n=76, (fig. 7). Este número de cromosomas, era, até agora, desconhecido.

Seria vão esforço tentar desenhar o idiograma de *S. babylonica* L., porquanto os cromosomas, em bastonete ou semi-lunares, são todos quase do mesmo tamanho e, dada a sua pequenez, é impossível reconhecer os tipos existentes. As constrições são de impossível localização. Não conseguimos identificar cromosomas satelitíferos.

Também nesta espécie nenhum dos cromosomas se se distingue do conjunto pelas suas desproporcionadas dimensões.

Meiose. — De entre os vários métodos experimentados para o estudo da meiose, só os esfregaços de anteras fixadas em álcool acético deram resultado. Pos este motivo, o estudo desta espécie é exclusivamente feito sobre preparações deste tipo.

Não nos foi possível fazer uma análise cariológica em estados anteriores à diacinese. As figuras deste estado, quer obtidas pelo carmim-acético quer pela orceína-acética, mostram a existência de uni, bi, tri e tetravalentes (figs. 8 *a* e *b*).

Metafase. — Nesta fase esboçam-se vários grupos de cromosomas, umas vezes ligados por pequenos filamentos outras por zonas, sendo difícil estudar a homologia da forma dos elementos associados (figs. 8 *c*, *d* e 9 *a*).

Estas associações (fig. 8 *c*), que não só se mantêm como se tornam mais nítidas na metafase final, e a regularidade do emparelhamento, põem de lado a ideia de que esses grupos sejam consequência de uma má fixação. A fig. 8 *c* e a microfot. 5 mostram o máximo de associação que nos foi possível encontrar. O número de elementos por grupo é, na maioria dos casos, de difícil determinacão.

As metafases mostram que as várias associações primárias observadas na diacinese persistem aqui, com nítido predomínio de bivalentes. O número de univalentes, porém, pode ir até ao máximo de 19. Na fig. 8 *d* julgámos ver 6 tetravalentes, 1 trivalente, 23 bivalentes e 5 univalentes. Na fig. 9 *a* apareceu-nos um par heteromórfico que julgamos poder identificar com o bivalente sexual referido por

Nakajima (1937, fig. 7, pág. 284). Apenas as metafases vistas de lado permitem distinguir este par desigual.

Vários autores têm referido o aparecimento de pares



Fig. 8. — *S. babylonica* L. *a*, Diacinese. Alcool acético—orceína acética. × 2.500. *b*, Diacinese. Idem, idem. × 2.000. *c*, Metafase I mostrando vários grupos associados secundàriamente. Alcool acético — carmim acético. × 2.500. *d*, Prometafase I com $6_{IV} + 1_{III} + 23_{II} + 5_{I}$. Alcool acético — orceína acética. × 2.000. Explicações no texto.

heteromórficos XY nas plantas masculinas das Salicáceas. Assim, como atraz referimos, BLACKBURN e HARRISON (1924), identificaram-no em *Populus tremula* L., *Salix viminalis* L. e *S. andersoniana* Sm.; MEÜRMAN (1925), em *P. trichocarpa* Hook., *P. balsamifera* L., *P. Simoni* Carr.; SINOTÔ (1929) em *S. japonica* Thunb., *S. leucopithecia*

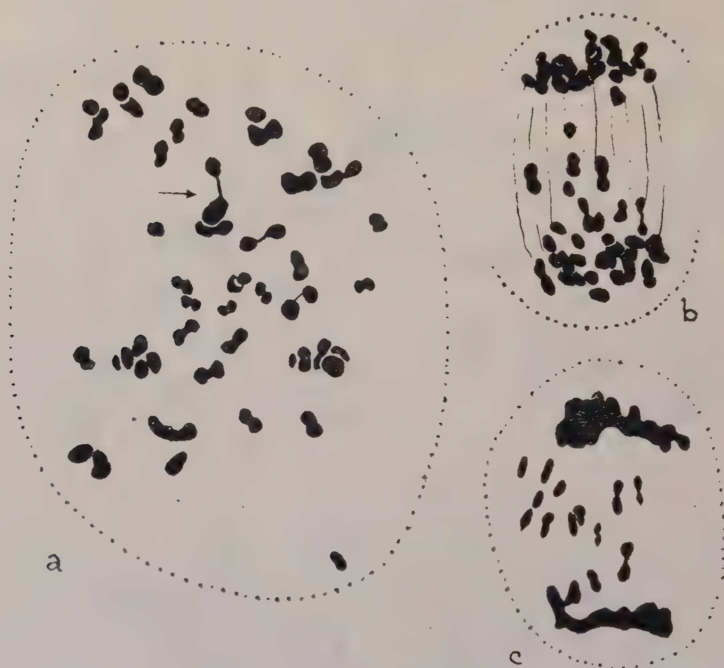


Fig. 9. — *S. babylonica* L. *a*, Meta-anafase I mostrando um par heteromórfico. Alcool acético—carmim acético. × 2.000. *b*, Anafase I mostrando univalentes que se dividiram a tempo de serem englobados nos grupos polares. Idem, idem. × 2.000. *c*, Anafase I mostrando univalentes que não serão incluidos nos grupos telofásicos. Explicação no texto. Idem, idem. × 2.000.

Kimura, *S. melanostachys* Makino, *S. sachalinensis*, *S. gracilistyla* *S. viminalis* var. *yezoensis* Schneider; NAKAJIMA (1937), em *P. Sieboldii* Miq., *S. Bakko* Kimura, *S. Caprea* L., *S. grandulosa* Seem., *S. babylonica* L., *S. integra* Thunb. e *S. sachalinensis* Fr. Schm. As nossas observações confirmam, portanto, as dos autores mencionados.

Anafase. — As anafases apresentam irregularidades, o que é de esperar dada a existência de univalentes. Como é sabido, os univalentes distribuem-se irregularmente pela célula, podendo muitos deles ficar nas proximidades dos polos. Os que apresentam esta localização podem ser englobados nos grupos polares, juntamente com os cromosomas resultantes da disjunção anafásica.

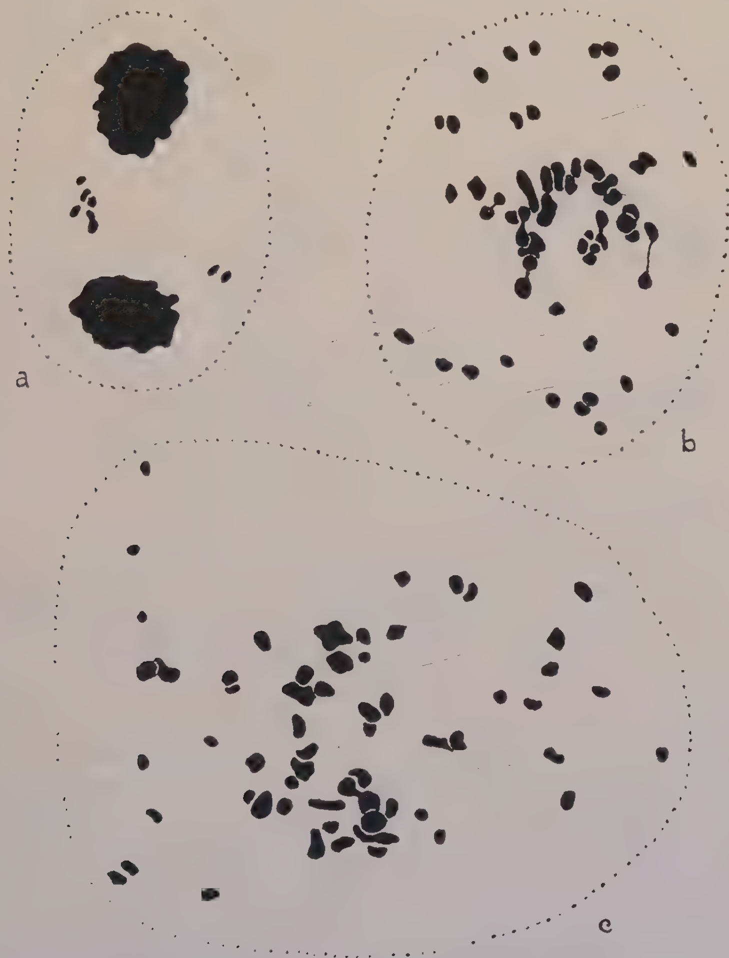


Fig. 10. — *S. babylonica* L. *a*, Telofase I de que resultariam provàvelmente dois micronúcleos. Alcool acético—carmim acético. × 1.600. *b*, Meta-anafase I mostrando univalentes. *c*, Meta-anafase I. Explicação no texto. Idem, idem. × 2.000.

Os outros, localizados mais próximo do plano equatorial, podem dispor-se em placa depois de ter sido iniciada a ascensão polar. Podem então dividir-se longitudinalmente e as duas metades caminharem para os polos respectivos, podendo ser englobados ainda nos grupos polares (fig. 9 *b*) ou não chegar a tempo (figs. 9 *c*, 10 *a* e microfot. 6). A fig. 10 *b* representa um caso em que os univalentes se distribuiram em dois grupos, de um e outro lado do plano equatorial, sendo provável que ambos esses grupos sejam englobados nos respectivos grupos polares.

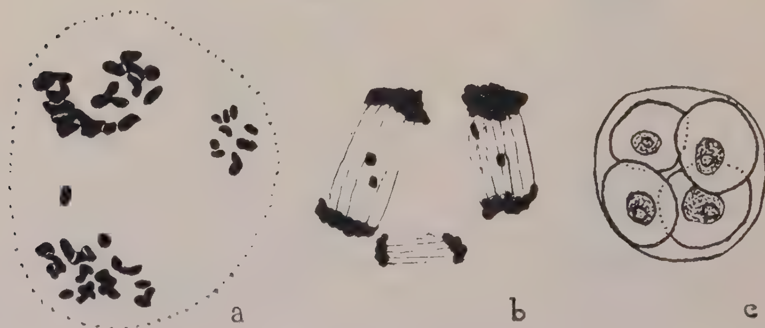


Fig. 11. — *S. babylonica* L. *a*, Metafase II mostrando quatro placas metafásicas, duas das quais provenientes de micronúcleos. Alcool acético—carmim acético. × 2.000. *b*, Anafase II constituida por dois grupos anafásicos normais e um grupo anormal proveniente de um micronúcleo. Explicação no texto. Idem, idem. × 1.400. *c*, Tétrade celular. Idem, idem. × 1.700.

Na fig. 10 *c*, é possível que, além de univalentes, existam também, entre eles, cromosomas resultantes da disjunção dos bivalentes de elementos mais pequenos, que, por via de regra, se separam mais cedo que os outros. Neste caso, é igualmente provável que a maior parte dos univalentes fique englobada nos grupos polares.

No caso dos univalentes ou os produtos da sua divisão não serem incluidos nos grupos telofásicos, ficam excluidos no citoplasma (fig. 10 *a*), originando micronúcleos que, por vezes, mais tarde degeneram em microcistos (fig. 12 *c* e *d*) (Chandler, Porterfield e Stout, 1937).

Divisão homotípica. — Os núcleos entram em profase passado um tempo relativamente curto. Dada a existência de univalentes, era de prever que esta divisão nos mostrasse anomalias. Encontrámos, de facto, várias irregularidades, uma das quais é mostrada na fig. 11 *a*. Vêem-se ali placas equatoriais, duas das quais — as que possuem maior número de cromosomas — correspondem aos núcleos normais da telofase I. As outras duas resultaram de micronúcleos, na constituição dos quais entraram, respectivamente, 1 e 9 univalentes. Os univalentes que não se

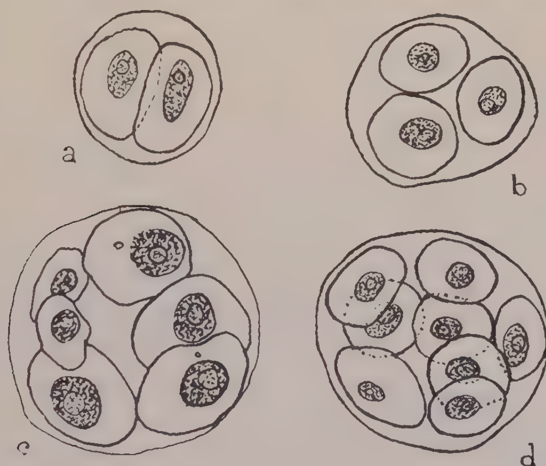


Fig. 12. — *S. babylonica* L. *a, díade; b, tríade; c, héxade; d, óctade* formadas em consequência das irregularidades meióticas descritas no texto. Alcool acético--carmim acético. *a* e *b* × 600. *c* e *d* × 1.400.

dividiram na divisão heterotípica dividem-se nesta divisão e o seu comportamento é normal. Os que, pelo contrário, se dividiram na primeira divisão não se dividem agora e comportam-se como retardatários. A fig. 11 *b* e microfotografia 7 mostram, além de uma anafase constituída por alguns univalentes que se dividiram regularmente na anafase II, duas outras anafases resultantes dos grupos principais de cromosomas, entre os quais havia alguns que se tinham dividido na primeira divisão e agora ficam atrasados no fuso, em consequência de não sofrerem 2.ª divisão.

Muitas das divisões decorrem com bastante regularidade, formando-se tétrades normais, (fig 11 *c*). Noutros casos, porém, em consequência das irregularidades apontadas, formam-se díades, tríades, héxades e óctades (fig. 12 *a-d*). Podemos admitir igual irregularidade na formação dos óvulos e, consequentemente, a possibilidade de aparecimento de indivíduos com números variáveis de cromosomas. É, porém, provável que, das constituições possíveis, só algumas sejam viáveis.

Em 1943, determinámos a percentagem de tétrades normais em anteras de verão e de inverno, assim como a percentagem de grãos de pólen normais, como resume o quadro seguinte:

TÉTRADES				PÓLEN			
Verão		Inverno		Verão		Inverno	
Norm.	An.	Norm.	An.	Norm.	An.	Norm.	An.
64	136	194	6	—	—	872	425
% Normal		% Normal		% Normal		% Normal	
32		97		—		67,2	

Analisando este quadro, verificamos que enquanto no verão encontrámos apenas 32 % de tétrades bem conformadas, no inverno esse número pode subir a 97 %.

Não determinámos a percentagem de pólen normal produzido no verão; a de inverno mostra ser igual a 67,2 %. Comparando estes dois valores de inverno (97 % e 67,2 %), vemos que apenas 70,2 % das tétrades bem conformadas dão grãos de pólen normais e possìvelmente viáveis, degenerando as restantes 29,8 %. Este último valor é bastante elevado e deve querer significar que, na maioria dos casos, os univalentes retardatários não atingem os polos a tempo de serem englobados nos grupos telofásicos, resultando daqui que, apesar de se terem formado quatro micrósporos de tamanho sensìvelmente normal, estes não eram contudo completos na sua constituição cromática e, por esse motivo, degeneraram.

Da análise do quadro conclui-se também que é maior a percentagem de tétrades normais de inverno que de verão, facto que atribuimos a uma mais elevada temperatura em que decorre a meiose neste período de floração. Irregularidades meióticas, provocadas por variações de temperatura, são citadas, entre outros autores, por Straub (1937) em *Gasteria trigona*; Johnsson (1940) em *Populus*; e Fernandes (1939) em *Narcissus jonquilla simples odorante.*

DISCUSSÃO

Embora neste trabalho tenhamos tratado apenas da cariologia de duas espécies do gén. *Salix*, os elementos colhidos são de molde a poder dar uma contribuição para a filogenia das Salicáceas.

É notória, dentro das Salicáceas, a extraordinária facilidade de hibridação no gén. *Salix* (Bailey, 1937; Rehder, 1940), enquanto que no gén. *Populus* quase se não conhecem híbridos naturais. A polinização cruzada, forçada pela dioicidade do gén. *Salix*, origina o aparecimento de formas novas, quando os gametas que se cruzam são de variedades ou espécies diferentes.

Na evolução do gén. *Salix* devem ter actuado, certamente, em larga escala, as mutações de genes. Este processo, porém, só poderia ser revelado pela análise genética, que não pudemos efectuar. Dada a pequenez e o elevado número de cromosomas, não nos foi possível pôr em evidência alterações estruturais, as quais devem também ter actuado, como indica Wilkinson (1944). Os estudos cariológicos efectuados puzeram, porém, em evidência que, no gén. *Salix*, actuaram e estão actuando os seguintes processos evolutivos: hibridação, poliplòidia e poliplòidia secundária.

Johnsson (1940), embora admita que o número básico 19 das *Salicaceae* não pode ser considerado primitivo pela remota origem das amentíferas, diz que em *Populus* o comportamento meiótico deve ter perdido todas as características da primitiva origem e que só a alta viabilidade dos aneuplóides revela que o número 19 é secundário.

No gén. *Salix* ainda não tinha sido referido o aparecimento de polivalentes em espécies diplóides. Estes polivalentes, a existirem, mostrariam que, entre certos elementos da guarnição haplóide, haveria um grau de homologia acentuado, indicando a probabilidade de existirem, nessa guarnição, cromosomas homólogos repetidos.

As nossas investigações revelaram *a existência de trivalentes numa espécie diplóide, S. salviifolia* Brot. A formação destes trivalentes mostra que há entre os elementos da guarnição mais de dois cromosomas homólogos e, portanto, que alguns cromosomas se acham repetidos. Esta repetição indica, pois, que o número básico primitivo das Salicáceas evolucionou, sofrendo alteração no número de elementos que o constituíam.

Além da ocorrência de trivalentes em uma espécie diplóide, as nossas observações mostraram que na espécie diplóide *S. salviifolia* Brot. apareciam, com grande frequência, associações secundárias (no sentido de LAWRENCE, 1931, MÜNTZING, 1933 e DARLINGTON, 1937).

São numerosíssimos os trabalhos em que os autores, baseando-se no aparecimento de associações secundárias, mostram que certos números básicos actuais não são primitivos, mas sim secundàriamente derivados de outros existentes em espécies ancestrais.

DILLEWIJN (1941), cita vários casos em que a associação secundária permitiu reconhecer certas plantas como poliplóides, derivados secundàriamente de uma espécie ancestral. Entre esses casos destacaremos os seguintes:

As Pomóideas ($2n = 34$), em que os bivalentes se apresentam formando na metafase I quatro grupos de dois, e três grupos de três [4 (2) + 3 (3)] de forma que o número básico é 7, característico da maioria das Rosáceas (DARLINGTON e MOFFETT, 1930; MOFFETT, 1931 e 1934).

LAWRENCE (1931), encontrou em *Dahlia Merckii* ($2n=36$), a associação 6 (2) + 2 (3) que o levou a concluir que a espécie era poliplóide, secundàriamente derivada de um antepassado com número básico 8.

MEÜRMAN (1933) indica para *Acer platanoides* o nú-

mero básico primitivo 12, em consequência do agrupamento 11 (1) + 1 (2).

NANDI (1936), encontrou em *Oryza sativa* (2n = 24), o agrupamento 3 (2) + 2 (3), interpretando assim esta espécie como alotetraplóide secundário com o número básido 5.

CATCHESIDE (1934, 1937), encontrou em *Brássica napus* (2n = 36), o arranjo 3 (2) + 3 (4) e em *B. oleracea* (2n=18), 3 (1) + 3 (2). O número básico primitivo, concordante nas duas espécies, seria pois igual a 6.

Para o gén. *Cicer* (2n=16), IYENGAR (1939) indica a composição metafásica 1 (3) + 2 (2) + 1 (1), o que dá o número básico 4.

Por vezes, a interpretação destas associações é mais difícil, particularmente quando, no decurso da evolução, se tenham dado fusões entre dois ou mais elementos da guarnição. Assim, em *Cardamine pratense* (2n=30), LAWRENCE (1931 *b*) encontrou fusão de dois cromosomas, de forma que o número originário seria 2n=32, e o número básico primitivo 8. Para DAVIE (1934), *Gossypium herbaceum* (2n=26) seria um tetraplóide (2n = 28) com fusão ulterior de dois cromosomas num cromosoma duplo.

Caso idêntico refere DILLEWIJN (1941) para *Populus*. Este autor encontrou no gén. *Populus* (fig. 10, op. cit.) quatro grupos de dois, e quatro grupos de três: 4 (2) + 4 (3), tendo de admitir que da fusão de dois cromosomas isolados resultou um cromosoma gigante. Para explicar a composição cromosómica do gén. *Populus* apresenta a formula AA' + BBB + CCC + DDD + EE + FF + GG + HH em que A' representa um duplo bivalente. Casos de associação secundária, formando um conjunto de 8 grupos, são indicados pelo autor em *P. nigra*, *P. nigra* var. *italica* Roi. e *P. brabantica*.

Nas meioses das espécies de *Salix* estudadas, não encontrámos ainda um cromosoma que pudessemos identificar ao cromosoma gigante de *Populus*. De resto, apenas BLACKBURN e HARRISON (1924) se referem a cromosomas «compostos» em *Salix*, dizendo «it is exceedling probable that the chromosomes so often refered to as four-lobed, are actually compound». Seriam estes cromosomas com-

postos que, por rotura, originaríam as formas com 22 e 44 cromosomas haplóides encontrados pelos autores respectivamente em *S. triandra* e *S. phylicifolia*. A existência de cromosomas compostos em *Populus* é referida por BLACKBURN e HARRISON (1924), MEÜRMAN (1925) e DILLEWIJN (1941). Este autor chama-lhes cromosomas gigantes.

BLACKBURN e HARRISON (1924), MEÜRMAN (1925), SINOTÔ (1925, 1928 e 1929), HARRISON (1926), etc., determinaram para número básico das Salicáceas, n=19. JOHNSSON (1940), partindo do princípio de que as Amentíferas são consideradas primitivas e dada a remota origem das Salicáceas dentro do grupo das Amentíferas, diz: «The x-number 19 in *Populus* and *Salix* cannot be considered to be a primary one», WILKINSON (1944) é da mesma opinião, embora acentue que: «The number 19 for the *Salicaceae* is, however, difficult to derive.....without speculation unjustified by known facts».

Entre as Amentíferas, as Salicáceas são as que possuem número básico mais elevado. Assim, os números haplóides conhecidos para as Amentíferas são:

n = 7 —Betuláceas, *Corylus* (WETZEL, 1929; WOODWORTH, 1931; FLOVIK, 1940).
n = 8 —Myricáceas, (*Myrica, Comptonia*) *Carpinus, Ostrya* (SUGIURA, 1927; WOODWORTH, 1931; STOKES, 1937).
n = 12—Fagáceas (*Castanea, Fagus, Quercus*) JARETZKY, 1930; NATIVIDADE, 1937; DUFFIELD, 1940).
n = 16—Juglandáceas (*Juglans, Carya, Pterccarya*) (BABCOCK, 1915; WOODWORTH, 1930).
n = 19—*Populus, Salix* (BLACKBURN e HARRISON, 1924; MEÜRMAN, 1925; HAKANSSON, 1929; NAKAJIMA, 1937).

A suposição de JONHSSON, segundo a qual o número básico 19 nas *Salicaceae* não pode ser considerado primário, não se baseia, porém, em nenhum dado real, tratando-se de uma mera conjectura. Este autor diz: «In *Pyrus* the x-number 17 is considered to be derived from a primary

x-number of 7. This conclusion is drawn mainly from the evidence of «secondary pairing» (Darlington e Moffett, 1930). Also in other species secondary pairing has been used as evidence of genome complexity (cf. Darlington 1937). In *Populus* and *Salix* secondary pairing has never been reported ».

Dillewijn (1941), porém, não só prova a existência de associações secundárias no gén. *Populus*, como ainda apresenta uma fórmula representativa da constituição cromosómica provável do género. Para Dillevijn, os homólogos do gén. *Populus* associam-se segundo o agrupamento 4 (3) + 4 (2) = 8 grupos, isto é, quatro grupos de três bivalentes, mais quatro grupos de dois bivatentes, em um total de 8 grupos de vinte bivalentes. O autor diz encontrar em perfeita associação secundária « sempre 3 grupos de 3 bivalentes, 4 grupos de dois e um par desigual, que se compõe do bivalente gigante e de um bivalente normal ».

Este agrupamento que Dillewijn propõe como provável para *Populus* conduz a um número básico actual 20, o que não é exacto nas Salicáceas.

Wanscher (1934), baseando-se nos trabalhos de Blackburn e Harrison (1924), Hakansson (1929) e Tischler (1927 e 1931) diz que, embora o número básico actual seja 19, a provável associação secundária mostrada por desenhos de placas de *Populus* e *Salix* e pelas diferenças nos tamanhos de cromosomas podem indicar um mais baixo número primário. Este podia ser quer 11 sugerido pelas séries 22--44, encontradas em *Salix* e em *Garryales (Garrya elliptica*, n=11), ordem próxima, quer 8, o provável número básico primário de outras amentíferas (Myricáceas, Juglandáceas).

As observações de Dillewijn (1941) apoiam assim a segunda hipótese de Wanscher (1934).

Meürman (1925), supõe que Blackburn e Harison referiram cromosomas compostos em *Salix* — compound by nature — em virtude de terem encontrado dois indivíduos de *S. triandra* respectivamente com 19 e 22 cromosomas.

Wilkinson (1944, pág. 280) diz que: « the size of *Salix*

chromosomes is very small, and similar for all species examined» (33 espécies).

Do mesmo modo não encontrámos nas espécies estudadas (1) qualquer cromosoma gigante comparável aos que Blackburn e Harrison (1924, Meürman (1925) e Dillewijn (1941) têm mencionado em *Populus*.

O modo de associação por nós observado em *Salix* é semelhante ao encontrado por Dillewijn, para *Populus*, mas, porque não entramos em linha de conta com o par desigual, que não existe nos salgueiros, somos levados a propor outra forma de agrupamento, que, além de estar de acordo com as nossas observações, dá ao fenómeno uma representação mais exacta. Assim, *encontrámos, no máximo de associação em S. salviifolia, sempre três grupos de três bivalentes e cinco grupos de dois bivalentes, em um total de 8 grupos de dezanove bivalentes,*

$$3\,(3) + 5\,(2) = 8$$

Os fenómenos de associação secundária postos em evidência conduzem, portanto, à conclusão de que o número básico primário do gén. *Salix* é 8. A existência de 8 cromosomas em *Myrica, Comptonia, Carpinus, Ostrya* e de 16 em *Juglans, Carya* e *Pterocarya* mostra que este número básico 8 é bem provável.

Thomas e Revel (1946), estudando a meiose de *Cicer arietinum*, foram levados à conclusão de que a associação secundária é devida às ligações estabelecidas no paquíteno entre as regiões heterocromáticas dos diversos cromosomas. Os mesmos autores verificaram, porém, que, em um tetraplóide obtido pela acção da colquicina, os bivalentes homólogos apareciam secundàriamente associados com uma frequência avaliada aproximadamente em 75% dos casos. Nestas condições, muitos dos arranjos encontrados nas associações secundárias devem corresponder a associações ùnicamente entre homólogos ou parcialmente homólogos e, por isso, se deve continuar a atribuir valor ao fenómeno

---

(1) Além das espécies indicadas, estudámos também a meiose de *S. repens* L. e a de *S. atro-cinerea* Brot. de que determinámos o número somático $2n = 76$.

da associação secundária, no que respeita ao auxílio que pode trazer ao esclarecimento do problema dos números básicos primários.

Admitindo, pois, que 8 é o número básico primário das Salicáceas, poderemos supôr que o número secundário 19 se estabeleceu do seguinte modo: a forma ancestral com $b = 8$ deu origem a tetraplóides, ou sejam formas com $n = 16$. Nestas formas, teria havido a repetição de 3 cromosomas, o que conduziria ao número gamético $n = 19$. A fusão de gametos deste tipo conduziria ao número somático $2n = 38$, característico dos diplóides actuais.

Assim, representando pelas letras A-H a guarnição primitiva, teríamos

A B C D E F G H

donde, por duplicação seguida de repetição de mais 3 elementos, teria resultado a actual guarnição haplóide, que poderá ser uma das seguintes:

AA + A		AA	
BB + B		BB	
CC + C		CC	
DD		DD + D	
EE	ou	EE + E	
FF		FF + F	
GG		GG	
HH		HH	etc.

Desta forma se explicaria o aparecimento de 3 grupos de 3 bivalentes e de 5 grupos de 2 bivalentes, número, aliás, em que se pode transformar o agrupamento de *Populus*, se se considerar o cromosoma gigante como um simples bivalente. *As Salicáceas seriam assim triplo-trisómico-diplóides para a base 8.*

Uma vez estabelecido o número 19, originaram-se, por poliplòidia, outras espécies, algumas triplóides, e outras tetraplóides, hexaplóides e octoplóides.

Na evolução do gén. *Salix* actuou, pois, de uma maneira intensa a multiplicação dos cromosomas. Esta multiplicação deve ter sido acompanhada de mutações génicas

e ainda de numerosas hibridações. Tudo isto permite compreender que a taxonomia do género apresente dificuldades.

Verificámos, ao estudar a meiose de *S. babylonica*, a existência de grande número de multivalentes e univalentes.

Como é sabido, a ocorrência de univalentes pode ser devida à estrutura híbrida ou a genes que impeçam a formação de «chiasmata», como acontece em certos indivíduos de *Zea Mays* (BEADLE e MCCLINTOCK, 1928) e de *Datura* (BERGNER, 1934).

Pelo que se conhece das características da meiose dos híbridos — não emparelhamento, existência de retardatários, formação de micronúcleos, etc., etc. —, somos levados a pensar que *S. babylonica* será provàvelmente um alopoliplóide. O Prof. Fernandes sugeriu-nos duas hipóteses para explicar a sua origem:

1. Suponhamos um autotetraplóide de constituição AAAA, resultante de uma forma ancestral AA. Admitamos que esta forma ancestral se cruzou com outra espécie diplóide A'A', no genómio da qual havia alguns cromosomas homólogos ou parcialmente homólogos com os do genómio A. Resultaria, assim, um híbrido, provàvelmente estéril, de constituição AA'. Mediante duplicação, esse híbrido poderia originar um anfidiplóide fértil de constituição AAA'A'.

S. babylonica poderia ter resultado da conjugação de um gameto AA do autopoliplóide com um gameto AA' do anfidiplóide —AA × AA'— o que originaria um híbrido especial, de constituição AAAA', em que o genómio A' não seria completamente diferente de A, podendo, por isso, os seus componentes emparelhar algumas vezes. Esta planta apresentaria o comportamento meiótico exibido pelos exemplares de *S. babylonica* estudados: formação ocasional de tetra e trivalentes, aparecimento frequente de bivalentes e formação de um número de univalentes compreendido entre 1 e 19,

As observações dos caracteres da morfologia externa não revelam a influência de qualquer outra espécie. Esta

particularidade, porém, não invalida a hipótese formulada, porquanto os 3 genómios A poderiam dominar inteiramente o único genómio A' presente.

O estudo das inflorescências mostrou-nos que em todos os exemplares examinados existiam, além de amentilhos masculinos, alguns hermafroditas e outros, embora mais raros, femininos. A poliplòidia e a hibridação poderiam ter como consequência a alteração da proporção dos cromosomas sexuais X e Y, resultando assim plantas hermafroditas.

O facto de Gorz (1929) indicar um híbrido — *S. babylonia* × *vittelina* Dod. — do qual diz: « O hibrido *S. babylonia* × *vittelina* é uma forma sempre andrógina (os amentilhos contêm flores masculinas, femininas e hermafroditas ao mesmo tempo, ou amentilhos masculimos e femininos produzidos sôbre o mesmo pé)», apoia também a idéia de que os exemplares estudados tenham uma constituição híbrida.

2. Consideremos um hexaplóide AAAAAA e um diplóide A'A'. Da conjugação destes indivíduos poderia ter resultado um tetraplóide AAAA'.

Esta segunda hipótese parece menos provável, pela dificuldade de cruzamento entre um gameto triplóide com um haplóide (Müntzing, 1937). Afora isto, permite formular as mesmas considerações que a anterior.

As hipóteses expostas admitem que os indivíduos de *S. babylonica* estudados são híbridos, embora com pequeno predomínio de uma das espécies progenitoras. No entanto, poderá acontecer que, além de indivíduos híbridos como estes, existam na natureza indivíduos não híbridos. Só o estudo meiótico de numerosos indivíduos, espalhados por diversas regiões, poderia decidir esta questão.

As nossas observações mostraram-nos a existência de cromosomas supranumerários heterocromáticos em *S. salviifolia* Brot. (pág. 208).

Blackburn e Harrison (1924) encontraram em uma forma de *S. triandra* n = 22 e em *S. phylicifolia* n = 44,

admitindo que estes números se tenham originado por uma rotura que provàvelmente ocorreu em um ou mais cromosomas compostos, de espécies que têm 19 cromosomas, tratando-se, portanto, respectivamente, de um diplóide e de um tetraplóide modificados. Blackburn e Harrison (1924) dizem: «In any case, whether we regard the nineteen or the twenty two as the original base number for the *Salicaceae*, we have a very interesting and suggestive occurrence indicating how it is possible for a second orthoploid series to be developed within the limite of the same natural order».

Sinotô (1929) encontrou em uma forma de *S. sachalinensis*, n = 24. Não excluindo a hipótese da rotura de alguns cromosomas, admite que este número pode provir de ter contado como bivalentes alguns univalentes que se tenham desemparelhado e fiquem misturados na placa metafásica. Diz ainda que o comportamento anormal dos cromosomas na meiose sugere uma origem híbrida para aquela forma.

Wilkinson (1944) admite também que as espécies com n = 32 tenham resultado de espécies com n = 19, por fragmentação de alguns cromosomas, considerando o número 22 também como um número básico das Salicáceas.

Dado o que se conhece sôbre a estabilidade do centrómero e o facto de os fragmentos acinéticos serem eliminados, não nos parece provável a hipótese de explicar por fragmentação o aparecimento das formas com n = 22. Na nossa opinião, essas plantas poderiam ter sido originadas pelo cruzamento de formas diplóides com triplóides (p. ex. $19 \times 25 = 44$). No entanto, o facto de termos encontrado em *S. salviifolia* plantas com 38 a 42 cromosomas, em que os cromosomas supranumerários eram heterocromáticos, sugere que as formas com n = 22 observadas por Blackburn e Harrison, poderão corresponder também a plantas em cuja guarnição haplóide existem 3 cromosomas desse tipo.

SUMÁRIO

1. Salienta-se a dificuldade que há em determinar com exactidão o número de cromosomas nas placas somáticas e em analisar as conformações existentes nas metafases meióticas de *Salix* em virtude das diminutas dimensões dos cromosomas e seu modo de distribuição nas placas. Refere-se a necessidade de uma técnica meticulosa para a obtensão de preparações.

2. Determina-se o número de cromosomas somático de *S. salviifolia* Brot. (2n=38) e de *S. babylonica* L. (2n=76). Apresenta-se um estudo da meiose de *S. salviifolia* Brot. e de *S. babylonica* L.

3. Relata-se a existência de cromosomas supranumerários heterocromáticos e de trivalentes em *S. salviifolia* Brot.. Verificou-se a existência de associações secundárias em *S. salviifolia* Brot. e *S. babylonica* L., notando-se que em *S. salviifolia* o máximo de associação é de 3 (3) + + 5 (2) = 8, o que permitiu concluir que o número 19 deve ter sido secundàriamente derivado de 8, por um mecanismo que se discute. As espécies diplóides serão, assim, triplo-trisómico-diplóides para a base 8.

4. Expõem-se duas hipóteses que explicam o comportamento meiótico irregular dos indivíduos de *S. babylonica* estudados. De acordo com essas hipóteses, estes individuos seriam alotetraplóides.

5. Atribui-se a existência de espécies aneuplóides no gén. *Salix* ao facto de estas possuirem cromosomas supranumerários heterocromáticos.

6. Discute-e a importância da existência de associações primárias e secundárias em *S. salviifolia* e o seu valor sob o ponto de vista filogenético. Discutem-se os factores que actuaram e estão actuando na evolução gén. *Salix*, salientando-se a importância da poliplòidia e da hibidração.

SUMMARY

1. The difficulty of determining accurately the number of chromosomes in the somatic plates of *Salix* and in observing their structure in the meiotic methaphases, on account of the small size of the chromosomes and of their peculiar distribution is pointed out. Attention is called to the need for a meticulous care in the preparation of the slides.

2. The somatic chromosome numbers were determined in *S. salviifolia* Brot. ($2n = 38$) and in *S. babylonica* L. ($2n = 76$), and their meiose was studied.

3. The existence of extra heterochromatic and trivalent chromosomes in *S. salviifolia* Brot. was revealed. Secondary associations in *S. salviifolia* Brot., and *S. babylonica* L. were reported, having been found that in *S. salviifolia* the maximum of association is $3\ (3) + 5\ (2) = 8$ which enable us to conclude that the number 19 must have probably arisen secondarily from an ancestral basic number of 8. Diploid specie will be, thus, triplo-trisomic diploids to base 8.

4. Two hypothesis are suggested to explain the irregular meiotic behaviour of the *S. babylonica*. In agreement with such hypothesis these individuals will be allotetraploids.

5. The existence of aneuploidy in *Salix* is explained by the presence of extra heterochromatic chromosomes.

6. The phylogenetic significance of the existence of primary and secondary associations of chromosomes in *S. salviifolia* Brot. is discussed. The factors which have acted and are acting in the process of evoluction of *Salix* are also reviewed. The view is put forward that gen. *Salix* is now composed of polyploids derived from an ancestral species having 8 as primary basic number.

BIBLIOGRAFIA

ALMEIDA, J. L. FERREIRA DE

1944 Contribuição para o conhecimento das espécies portuguesas do género *Salix*. — *Publ. Serv. Flor. Aqui.* **11**, (no prelo).

BABCOCK, E. B.

1915 Walnut mutant investigations. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1**: 535-537. (Cit. GAISER, 1830).

BAILEY, L. H.

1937 *The Standard Cyclopedia of Horticulture.* **3** (2.ª ed.). The MacMillan Company. New York.

BEADLE, C. H. and McCLINTOCK, B.

1928 A genic disturbance of meiosis in *Zea Mays. Science.* **68**. (Cit. JOHNSSON, 1940).

BERGNER, A. D., CARTLEDGE, J. L. and BLAKESLEE, A F.

1934 Chromosome behaviour due to a gene, which prevents metaphase pairing in *Datura. Cytologia.* **6** : 19-37.

BERGSTRÖM, I.

1940 On the progeny of diploid × triploid *Populus tremula* with special reference to the occurrence of tetraploidy. *Hereditas.* **26** : 191-201.

BLACKBURN, K. B. and HARRISSON, J. W. H.

1924 A preliminary account of the chromosomes and chromosomes behaviour in the *Salicaceae. Ann. Bot.* **38**.

BOWDEM, M. W.

1940 Diploidy, polyploidy, and winter hardiness relationships in the flowering plants. *Am. Journ. Bot.* **27** : 357-371.

CATCHESIDE, D. G.

1934 The chromosome relationships in the swede and turnip groups of *Brassica. Ann. Bot.* **48** : 601-633.

1937 Secondary pairing in *Brassica oleracea.* Cytologia, *Fugii Jubilaei Volumen.*

CHAMBERLAIN, C. J.

1932 *Methods in plant histology.* 5th rev. ed. University of Chicago Press. Chicago.

DARLINGTON, C. D.

1932 *Recent advances in citology.* J. & A. Churchill Ltd., London.

1937 *Recent advances in citology.* 2nd ed. J. & A. Churchill Ltd., London.

DARLIGTON, C. D. and JANAKI-AMMAL, E. K.

1945 *Chromosome atlas of cultivated Plants.* George Allen & Unwin Ltd. London.

DARLINGTON, C. D. and MOFFETT, A. A.

1930 Primary and secondary chromosome balance in *Pyrus. Journ Genet.* **22** : 129-151. (Cit. Johnsson, 1940).

DARLINGTON, C. D. et UPCOTT, M. B.
1941 The activity of inert chromosomes in *Zea Mays*. *Journ. Genet.* **41**: 275-296.
DAVIE
1934 (Cit. DILLEWIJN, 1941).
DILLEWIJN, C. van
1941 Zytologische Studien in der Gattung *Populus* L. *Genetica*. **22**: 131-182.
DUFFIELD, J. W.
1940 Chromosome counts in *Quercus*. *Amer. Journ. Bot.* **27**: 787.
FERNANDES, A.
1934 Nouvelles études caryologiques sur le genre *Narcissus* L. *Bol. Soc. Broteriana* **9** (2.ª sér.): 1-201.
1039 *a* Sur le comportement d'un chromosome surnuméraire pendant la mitose. *Scientia Genetica* **1**: 141-166.
1939 *b* Sur la caryo-systematique du groupe *Jonquilla* du genre *Narcissus* L. *Bol. Soc. Broteriana* **13** (2.ª sér.): 487-542.
1943 Sur l'origine des chromosomes surnuméraires hétérochromatiques chez *Narcissus Bulbocodium* L. *Bol. Soc. Broteriana* **17** (2.ª sér.): 251-256.
1946 Sur le comportement des chromosomes surnuméraires hétérochromátiques pendant la méiose. I. Chromosomes longs hétérobrachiaux. *Bol. Soc. Broteriana* **20** (2.ª sér.): 88-154.
FERNANDES, A. et SERRA, J. A.
1944 Euchromatine et hétérochromatine dans leurs rapports avec le noyau et le nucléole. *Bol. Soc. Broteriana* **19** (2.ª sér.): 67-124.
FLOVIK, K.
1940 Chromosome numbers and poliploidy within the flora of Spitzbergen. *Hereditas* **26**: 430-440.
GÖRZ, R.
1929 *Cavanillesia* **2** (fasc. 7-10).
HÄKANSSON, A.
1929 Die chromosomen in der Kreuzung *Salix vimianlis* × *Caprea* von Heribert Nilsson (with a Summary in English). *Hereditas* **13** (1): : 1-49.
1933 Die konjugation der chromosomen bei einigen *Salix*-bastarden (with a Summary in English). *Hereditas* **18** (1,2): 199-214.
1938 Zitologische Studien an *Salix*-bastarden (with Summary in English). *Hereditas* **24** (1-2): 1-31.
HARRISON, J. W. H.
1926 Heterochromosomes and polyploidy. *Nature* (II Journ Scien.).
HEITZ, E.
1936 Die Nukleal-Quetschmethode. *Ber. Deuts. Bot., Gesellsch.* **53**: : 870-878.
HOLMBERG
1931 In « *Chromosome Atlas of Cultivated Plants* » George Allen & Unwin Ltd. London. 1945.
IYENGAR
1939 Cit. DILLEWIJN, 1941.

JARETZKY, R
1930 *Planta* **10** : 120 (Cit. Darlington e Janaki-Ammal, 1945).
JOHANSEN, D. A.
1940 *Plant Microtechnic.* McGraw-Hill Book Company, Inc., New York and London.
JOHNSSON H.
1940 Cytological studies of diploid and triploid *Populus tremula* and of crosses between them. *Hereditas.* **26** : 321-352.
LA COUR, L.
1931 Improvements in every day technique in plant cytology. *Journ. Roy. Micr. Soc.* **51** : 119-126.
1937 Improvements in plant cytological technique. *Bot. Rev.* **3** : 241-258.
LAWRENCE, W. J. G.
1931 The secondary association of chromosomes. *Cytologia.* **2** (4) : 352-384
MARKLUND
1942 In «*Chromosome Atlas of Cultivated Plants*». George Allen & Unwin Ltd. London. 1945.
McCLINTOCK, B.
1929 A method for making aceto-carmim smears permanent. *Stain. Tech.* **4** : 53-56.
1933 The association of nonhomologous parts of chromosomes in mid--prophase of meiosis in *Zea Mays*, Zeits. *Zellf. u. mikr. Anat.* **19** : : 191-237. (cit. FERNANDES, 1946).
MEÜRMAN, O.
1925 The chromosome behaviour of some dioecious plants and their relatives with special reference to the sex chromosomes. *Soc. Scient. Fenn. Comment. Biol.* **2** : 3.
1933 Chromosome morphology, somatic doubling and secondary association in *Acer platanoides* L. *Hereditas* **18** : 145-173.
MOFFETT, A. A.
1931 e 1934 Cit. DILLEWIJN, 1941.
MÜNTZING, A.
1933 Studies on meiosis in diploid and triploid *Solanum tuberosum* L. *Hereditas* **17** : 223-245.
1936 The chromosomes of a giant *Populus tremula* L. *Hereditas* **21** : 383-393.
1937 Sterility and chromosome pairing in intraspecific *Galeopsis* hybrids. *Hereditas* **26** : 117-118.
NAKAJIMA, G.
1937 Cytological studies in some dioecious plants. *Cytologia, Fujii Jubilaei Volumen.* 282-292.
NANDI, H. K.
1936 The chromosome morphology secondary association and origin of cultivated Rice. *Journ. Genet.* **33** : 315-336.
NATIVIDADE, J. V.
1937 Recherches cytologiques sur quelques espècies et hybrids du Genre *Quercus. Bol. Soc. Broteriana* XII, 21-85.

NILSSON, HERIBERT

1928 In « *Acta Univ. lund. s.* 2, **24** : 89 »

1935 Die analyse der synthetisch hergestellten *Salix lautina*. *Hereditas* **20** : : 339-353.

RANDOLPH, L. F.

1928*a* Types of supernumerary chromosomes in maize. *Anat. Rec.* **41** : 102. (Cit. FERNANDES, 1946).

1928*b* Chromosome numbers in *Zea Mays* L. *Mem. Cornell. Agric. Exp. Sta.* N.º **117** : 1-44. (Cit. FERNANDES, 1946).

REHDER, A.

1927 *Manual of cultivated Trees and Shrubs.* MacMillan C.º, New York.

SINOTÔ, Y.

1925 Heterochromosomes in some dioecious plants. *Bot. Mag. Tokyo* **39** : 305.

1928 On the chromosome number and the unequal pair of chromosomes in some dioecious plant. *Proc. Imp. Acad. Tokyo,* **42** : 175-177. (Cit. GAISEB, 1930).

1929 Chromosome studies in some dioecious plants, with special reference to the allosomes. *Cytologia,* **1** : 109-191.

SKOVSTED, A.

1929 Cytological investigations of the *Genus Aesculus* L. *Hereditas,* XII.

SOKOLOVSKAJA, A. e STRELKOVA, O.

1941 *C. R. Ac. Sic. U. R. S. S.,* **32** : 144. (Cit. DARLINGTON e JANAKI AMMAL, 1945).

STOKES, J.

1937 Cytological studies in the *Myricaceae. Bot. Gaz.,* **99** : 387.

SUGIURA, T.

1927 Some observations on the meiosis of the pollen mother-cells of *Carica papaya, Myrica rubra, Aucuba japonica* and *Beta vulgaris. Bot. Mag. Tokyo,* **41** : 219-224. (Cit. GAISER, 1930).

THOMAS, P. T. and REVELL, S. H.

1946 Secondary association and heterochromatic attraction. I. *Cicer arietium Ann. Botany* **10** : 159-164.

TISCHLER, G.

1927 e 1931 Pflanzhiche Chromosomen — Zahlen. Tabulae Biol. 4 and 7 — 1927 e 1931. (Cit. WANSCHER, J. H., 1934).

WANSCHER, J. H.

1934 Basic Chromosome Number of the Higher Plants. *New Phytologist.*

WARMKE, H. E.

1942 A *section-smear method for plant cytology.* Dep. of Genet., Carnegie Inst. of Washington, Cold Spring Harbor, N. Y.

WETZEL, R.

1919 Dissertation, Marburg, 60 pg. (Cit. DARLINGTON e JANAKI-AMMAL, 1945).

WILKINSON, J.

1941 The cytology of the Criket Bat Willow. *Ann. Bot.*, **5** : 149-167.

1944 The Cytology of Salix in Relation to its Taxonomy. *Ann. of Botany*, **8** : 269-283.

WOODWORTH, R. H.

1930 *Amer. J. Bot.* **17** : 863. (Cit. DARLINGTON e JANAKI, 1945).

1931 Polyploidy in the *Betulaceae*. *J. Arnold Arb.*, **12** : 206.

EXPLICAÇÃO DA ESTAMPA

ESTAMPA I

Salix salviifolia Brot.

1 — Metafase I mostrando a composição $1_{III} + 17_{II} + 1_{I} + 3$ supra heterocromáticos (sendo $1_{II} + 1$ associado com um bivalente eucromático). × 2.000.

2 — Metafase I mostrando $19_{II} + 3$ cromosomas supranumerários heterocromáticos ligados por um ténue filamento aos cromosomas longos. (Confrontar com a fig. texto 2 c). × 1.750.

3 — Metafase I. Por vezes os bivalentes aparecem tão contactados que se torna difícil distinguir os elementos contituitivos. × 2.000.

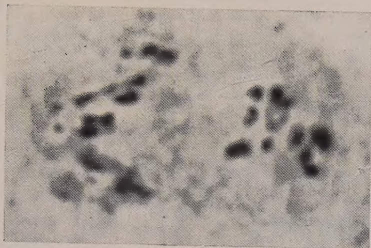
4 — Metafase I mostrando o máximo de associação: $3 (3) + 5 (2) = 8$ grupos de 19_{II}. × 2.750.

Salix babylonica L.

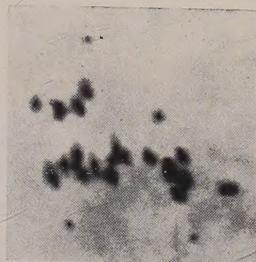
5 — Metafase I. Não obstante um maior número somático os bivalentes associaram-se secundàriamente. × 2.200.

6 — Ana-telofase I mostrando univalentes que não se dividiram a tempo de serem englobados nos grupos polares. × 2.000

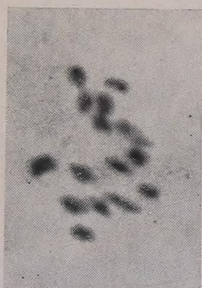
7 — Anafase II. Placa mostrando duas anafases normais e uma terceira correspondente à divisão de univalentes. × 1.750.



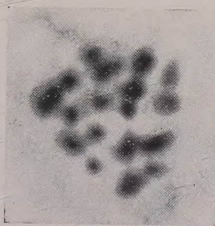
1



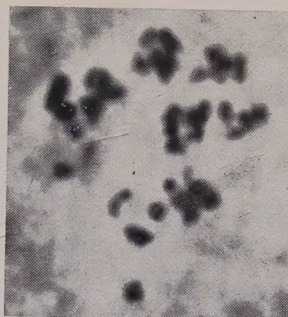
2



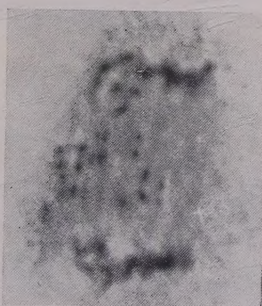
3



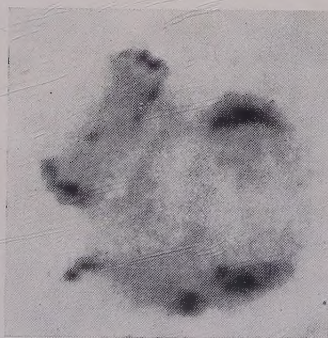
4



5



6



7

ÍNDICE